

Національна академія наук України
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського
Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Декіна Світлана Сергіївна

УДК 547.56:577.151.4:577.152.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОТЕХНОЛОГІЯ МУКОАДГЕЗИВНИХ ЛІЗОЦИМ-ПОЛІМЕРНИХ
СИСТЕМ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ С.С. Декіна

Науковий консультант:

Романовська Ірина Ігорівна, доктор біологічних наук, професор, завідувача лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології, заступник директора з наукової роботи Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України

КИЇВ – 2020

АНОТАЦІЯ

Декіна Світлана Сергіївна. Біотехнологія мукоадгезивних лізоцим-полімерних систем медичного призначення. – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія. Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, 2020. Дисертаційна робота виконана в Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України.

Дисертація присвячена розробці та застосуванню біотехнологічних підходів до іммобілізації лізоциму в полімери синтетичного і природного походження, з метою створення нових мукоадгезивних систем антибактеріальної дії.

Удосконалено метод виділення лізоциму з протеїну курячого яйця, що дозволяє отримувати ензим з виходом 3,2% від загального вмісту протеїну і активністю 22025 ± 1500 од/мг, подібний до комерційного препарату лізоциму фірми "AppliChem". Модифікація методу полягає в п'ятикратному розведенню білка (замість 30-кратного) з подальшим висолюванням неденатурованих протеїнів 5% розчином карбонату калію; введенні додаткових трьох стадій діалізу для видалення низькомолекулярних домішок; проведенні стадії зворотного діалізу з сухим крохмалем з метою отримання ензиму в кристалічному вигляді. Методами мас-спектрометрії і SDS-електрофорезу в 10% ПААГ встановлено гомогенність, білково-фракційний склад, підтверджено чистоту виділеного ензиму (~ 95-98%). Запропонована модифікація методу В.Я. Мікельсона дозволяє отримувати в кристалічному вигляді стабільний активний лізоцим з протеїну курячого яйця в лабораторних умовах, що відрізняється високим ступенем чистоти, перспективний для використання в біотехнології.

Методом QSAR аналізу вперше досліджено вплив йонів лужних, лужноземельних і перехідних металів на гідролітичну активність лізоциму. Встановлено інгібуючий каталітичну активність ензиму вплив іонів металів. Найнижча гідролітична активність спостерігається при взаємодії лізоциму з катіонами лантану La^{3+} (33,0%), алюмінію Al^{3+} (14,3%), заліза Fe^{2+} (37,8%) і літію Li^+ (34,8%). Пригнічення активності ензиму відбувається через зміну конформації білкової молекули, утворення комплексу з металами. Проаналізувавши як дескриптори, що описують властивості іонів металів, близько 70 характеристик, з використанням ентропії і ентальпії, а також електронегативності, вперше отримано QSAR модель, що адекватно описує вплив іонів металів на гідролітичну активність лізоциму.

Досліджені взаємодії лізоциму з полімерами методами віскозиметрії, мас-спектрометрії MALDI, УФ-спектроскопії, люмінесценції та ін. Вперше виявлено, що процеси іммобілізації індуюють молекулярні механізми дезагрегації асоціатів лізоциму шляхом комплексоутворення. Показано, що стабілізація ензиму розчинами полімерів відбувається за рахунок утворення асоціатів ензим-полімер і залежить від природи, структури і концентрації полімерних носіїв. При цьому комплексоутворення з синтетичними полімерами (ПВП, ПВС), що мають в своєму складі множинні карбонільні і гідроксигрупи характерне міншою мірою. Найміцніші взаємодії лізоцим-полімер за рахунок електростатичних сил спостерігаються для желатину, що має в своєму складі також карбоксильні і аміногрупи, і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (карбоксильні групи). Отримані результати в подальшому використані при розробці ефективних мукоадгезивних препаратів ензиму пролонгованої дії, відповідно до поставлених біотехнологічних завдань.

Визначені підходи до стабілізації та пролонгування гідролітичної дії лізоциму на слизових оболонках шляхом використання полімерів різної мукоадгезивної сили. Розроблені полімерні системи антибактеріальної дії з

іммобілізованим лізоцимом у вигляді розчинів, гелів, покриттів гідрогелевих і таблетованих сумішей. Експериментально обґрунтовано використання для іммобілізації мукоадгезивних полімерів, досліджені комплекси полімерна матриця/БАР з лізоцимом, що сприяють прояву ензимом максимальної гідролітичної активності, збереженню і розширенню антимікробних властивостей, пролонгованості терапевтичної дії і високої стабільності різних форм лізоциму.

Розроблено препарат лізоциму для слъозозамінної терапії «штучна слъоза», який характеризується високим збереженням гідролітичної активності включеного ензиму (95,5%). Стабілізація ензиму досягається шляхом утворення іонних зв'язків між гідроксильними групами декстрану і аміногрупами лізоциму, а мукоадгезивні властивості посилюються додаванням гідроксипропілметилцелюлози. Розроблена «штучна слъоза» має близькі зі слізною рідиною значення в'язкості, густини і осмоляльності і відповідає вимогам, що пред'являються до очних крапель. Лізоцим, стабілізований полімерами, після попередньої стерилізуючої фільтрації зберігається в умовах низьких температур (0-4 ° С) протягом 12 місяців з 96% збереженням вихідної гідролітичної активності. Вивчення офтальмонешкідливості, а також фармакотерапевтичної ефективності очних крапель «штучна слъоза з лізоцимом», проведеної на моделі травматичного кератиту, показали відсутність алергізуючої дії і ефективну протизапальну і регенераційну дії, сприяючи більш швидкій ліквідації запалення і прискоренню процесу епітелізації ушкодженої рогівки експериментальних тварин в порівнянні з контролем.

З використанням натрієвої солі карбоксиметилцелюлози як матриці здійснено іммобілізацію лізоциму і лізоциму з кверцетином шляхом включення в гель. Показано, що при масових відношеннях лізоцим: кверцетин: полімер (1: 0,4: 6) спостерігається кількісне включення лізоциму і кверцетину, повне збереження гідролітичної активності ензиму. Отриманий

гель є мукоадгезивним з високими адгезійними властивостями до слизової оболонки (6000 Па), характеризується пролонгованою дією. Імобілізований лізоцим активний в широкому діапазоні значень рН, стабільний в кислому середовищі і при тривалому зберіганні (0-4 °С), чому сприяють йонні взаємодії ензиму з носієм. В біологічних експериментах показано ефективність терапевтичної дії гелю з лізоцимом і кверцетином при запаленні слизової оболонки порожнини рота щурів в індометациновому тесті. У щурів з гінгівітом достовірно збільшується рівень малонового діальдегіду, еластази і уреази, однак знижується рівень лізоциму і каталази. Використання гелю з лізоцимом і кверцетином нормалізує вищезазначені показники. Розроблений мукоадгезивний гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином є препаратом з комплексною біологічною активністю і перспективний для проведення подальших біомедичних досліджень.

Запропоновано спосіб кріоіммобілізації лізоциму в полівініловий спирт (М.м. 120 кДа). Отримано гідрогелеве покриття з кількісним збереженням білка і високою гідролітичною активністю ензиму. Препарат характеризується розширеним рН-профілем гідролітичної активності лізоциму в області кислих значень, стабілізований в кислому середовищі і зберігає 95% активності протягом 3 місяців. Процес виходу лізоциму з кріогелю відбувається рівномірно - 50% за перші 30 хв, 50% в наступні, і пояснюється пористою морфологією носія, що забезпечує дифузійно-незатруднене вивільнення в зовнішнє середовище. Кріоіммобілізований лізоцим проявляє виражену бактерицидну дію стосовно тест-штамів *Staphylococcus aureus* і бактеріостатичну стосовно тест-штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Показано, що іммобілізований лізоцим чинить протизапальну і антидисбіотичну дії при модельованому ліпополісахаридом запаленні слизових оболонок порожнини рота експериментальних тварин.

Імобілізацією лізоциму в комплексну матрицю на основі желатину і

натрієвої солі карбоксиметилцелюлози отримані мукоадгезивні плівкові форми спрямованої пролонгованої дії, довготривалого строку зберігання (3 роки). Слід зазначити сильні мукоадгезивні властивості отриманого препарату, так, сила його адгезії до слизової оболонки становить 4380 Па. За необхідності силу мукоадгезії можна посилювати або зменшувати шляхом варіювання масового співвідношення желатин/ натрієва сіль карбоксиметилцелюлози. Включений в полімерну матрицю лізоцим стабільний після іммобілізації і стерилізації γ -опроміненням (28 кГр), завдяки радіопротекторній дії желатину. Результати скануючої електронної мікроскопії показали цілісність поверхні і характер розподілу іммобілізованого лізоциму у матриці. Полімерна система містить агломерати різного розміру, але не більше 3 мкм в діаметрі (якщо допустити, що частинки мають сферичну форму). Препарат ефективний в лікуванні експериментального стоматиту у щурів, викликаного бджолиною отрутою, зі зниженням активності еластази, вмісту малонового діальдегіду (показників запалення) і активності уреазі (маркера мікробного обсіменіння слизових оболонок) на 63,2, 80,9 і 97,5%, відповідно.

Завдяки проведеним теоретичним, технологічним і аналітичним дослідженням розроблену композицію іммобілізованого лізоциму і кверцетину покладено в основу лікувально-профілактичного таблетованого препарату антидисбіотичної дії «Лізоцим ФОРТЕ», що характеризується пролонгованим антимікробним, антиоксидантним, імуностимулюючим і капіляропротекторним ефектами.

В результаті досліджень за визначенням чутливості тест-штамів, рекомендованих ГФ України, до діючих речовин таблетки, встановлено антимікробну дію лізоциму, яка проявляється в різному ступені і залежить від роду і штаму мікроорганізму. Показано, що додавання хлоргексидину біглюконату у всіх випадках (щодо грамнегативних, грампозитивних бактерій і дріжджоподібних грибків) сприяє розширенню спектра

антимікробної дії ензиму; введення комплексона динатриевої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти в дану композицію в більшій мірі проявляється по відношенню до грамнегативних бактерій *E. coli* і дріжджоподібних грибків *Candida albicans*.

Обрана технологія вологого гранулювання для отримання таблетованих сумішей лізоциму і кверцетину дозволила створити іммобілізований препарат з повним збереженням гідролітичної активності та інших фізико-хімічних і біохімічних властивостей ензиму.

Визначено методи кількісного аналізу діючих компонентів таблеткових сумішей: лізоциму і кверцетину. Грануляти з використанням запропонованих трьох композицій наповнювачів, а саме, лактози моногідрату/маніту/повідону К-17; лактози моногідрату/маніту/карамелози; цитрату кальцію/крохмалю/желатину зберігають фізичні, хімічні і механічні властивості протягом 1 року в герметично упакованому стані при температурі 0-4 °С.

Дослідження антимікробної і протизапальної дії таблеткових сумішей на експериментальних тваринах показало, що запропонована композиція, в якій ензим поєднується з кверцетином і желатином, сприяє збільшенню вдвічі в слизовій оболонці щокі рівня лізоциму в порівнянні з препаратом «Лізак». Аналогічний характер змін спостерігається для антиоксидантно-прооксидантного індексу: його значення збільшується в 1,7 рази в порівнянні з таблетками «Лізак».

В результаті проведеного комплексу досліджень найбільш перспективна щодо збереження бактеріолітичної активності і терапевтичної ефективності композиція з іммобілізованим в желатин лізоцимом була впроваджена на НВА «Одеська біотехнологія» у вигляді біологічно активної добавки «Лізоцим ФОРТЕ» (Технічні умови України (ТУ У) 10.8-27420386-004: 2016).

Оцінка кінетичних параметрів функціонування лізоциму після

іммобілізації в гель, кріогель і полімерні плівки свідчить про різний вплив полімерів на каталітичну активність ензиму (желатину меншою мірою, ніж вплив натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту), яке проявляється в збільшенні константи Міхаеліса, максимальної швидкості реакції і відношення $K_M/V_{\text{макс}}$, що пояснюється перехідною активацією ферменту.

В усіх випадках обрані і реалізовані методи нековалентної іммобілізації в полімерні матриці позитивно позначаються на функціонуванні лізоциму: стабілізують молекулу ензиму, сприяють розширенню рН- і термопрофілю активності, тривалому зберіганню, забезпечують спрямовану гідролітичну дію на слизові оболонки за рахунок мукоадгезивних властивостей полімерів. При цьому іммобілізований ензим характеризується антимікробною, протизапальною дією, що доведено мікробіологічними випробуваннями і на моделях травматичного кератиту, стоматиту і гінгівіту. Використання в роботі сучасних аналітичних методів моніторингу ефективності іммобілізації надає важливу інформацію про вплив даного процесу на стабільність і активність ензиму, вносять значний вклад в стратегію іммобілізації лізоциму, у тому числі для розробки ефективних препаратів медичного призначення.

Ключові слова: біотехнологія, лізоцим, мукоадгезивні лікарські форми, іммобілізація, полімери.

SUMMARY

Dekina Svetlana Sergeevna. Biotechnology of mucoadhesive lysozyme-polymeric systems for medical purpose. - Qualification scientific work on the rights of manuscript.

The thesis for a scientific degree of the Doctor of biological sciences by specialty 03.00.20 – biotechnology. – The National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute» of the Ministry of Education and Science of Ukraine, 2020. Thesis was accomplished at A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute NAS of Ukraine.

The thesis is devoted to the development and application of biotechnological approaches for the enzymes immobilization, particular by lysozyme, with the aim of developing new polymeric systems of antibacterial action with immobilized lysozyme on the way to solving the global problem - the development of resistance of microorganisms to antibiotics.

The method for isolating lysozyme from hen egg white has been improved, which makes it possible to obtain an enzyme with a yield of 3.2% and an activity of 22025 ± 1500 U/mg, comparable to the commercial lysozyme from «AppliChem». The modification of the method consists in five-fold dilution of the protein (instead of 30-fold) with subsequent salting out of the undenatured proteins with a 5% potassium carbonate solution, the introduction of an additional three stages of dialysis to remove low molecular weight impurities; conducting the stage of reverse dialysis with dry starch in order to obtain the enzyme in crystalline form. The homogeneity, protein-fractional composition and purity of the isolated enzyme (~ 95–98%) were confirmed by mass spectrometry and SDS-electrophoresis in 10% SDS-PAGE.

The proposed modification of V.Ya. Mikelson method allows you to get in crystalline form, a stable active lysozyme from of hen egg white in laboratory

conditions, characterized by a high degree of purity, promising for usage in biotechnology.

The method of QSAR analysis was used to study the effect of alkali, alkaline earth and transition metal ions on the hydrolytic activity of lysozyme. The effect of metal ions inhibiting the catalytic activity of the enzyme has been established. The lowest hydrolytic activity is observed upon the interaction of lysozyme with cations of lanthanum La^{3+} (33.0%), aluminum Al^{3+} (14.3%), iron Fe^{2+} (37.8%) and lithium Li^{+} (34.8%). The suppression of enzyme activity occurs due to changes in the conformation of the protein molecule, the formation of a complex with metals. About 70 characteristics are analyzed as descriptors describing the properties of metal ions. Using entropy and enthalpy, as well as electronegativity, the QSAR model was first obtained, which adequately describes the effect of metal ions on the hydrolytic activity of lysozyme.

The interactions of lysozyme with polymers were studied by the methods of viscometry, MALDI mass spectrometry, UV spectroscopy, luminescence, etc. It was first discovered that immobilization processes induce molecular mechanisms for the disaggregation of lysozyme associates through complexation. It was shown that stabilization of the enzyme with polymer solutions occurs due to the formation of enzyme-polymer associates and depends on the nature, structure and concentration of polymer carriers. Moreover, complexation with synthetic polymers (PVP, PVA), which have multiple carbonyl and hydroxy groups in their composition, is less characteristic. Strong lysozyme-polymer interactions due to electrostatic forces are observed for gelatin, which also has carboxyl and amino groups, and the sodium salt of carboxymethyl cellulose (carboxyl groups). The results obtained were subsequently used in the development of effective mucoadhesive preparations of a prolonged action enzyme, in accordance with the set biotechnological objectives.

The approaches to stabilization and prolongation of the hydrolytic effect of lysozyme on the mucous membranes by using polymers of different mucoadhesive

strength are determined. Polymeric systems with immobilized antibacterial lysozyme in the form of solutions, gels, hydrogel coatings and tablet mixtures have been developed. The usage of mucoadhesive polymers for immobilization has been experimentally substantiated; polymeric matrix / BAS complexes with lysozyme have been studied, which contribute to the manifestation of maximum hydrolytic activity by the enzyme, preservation and expansion of antimicrobial properties, prolonged therapeutic effect and high stability of various forms of lysozyme.

A lysozyme preparation for tear replacement therapy “artificial tear” was obtained, which is characterized by high preservation of the hydrolytic activity of the included enzyme (95.5%). Stabilization of the enzyme is achieved by the formation of ionic bonds between carboxylic groups of dextran and amino groups of lysozyme, and mucoadhesive properties are provided by the addition of hydroxypropyl methylcellulose. The developed “artificial tear” has values of viscosity, density and osmolality that are similar to tear fluid, which fits the requirements for eye drops. Lysozyme stabilized by polymers, after preliminary sterilizing filtration, is stored at low temperatures (0-4 ° C) for 12 months with 96% retention of the initial hydrolytic activity. The study of ophthalmic safety and pharmacotherapeutic efficacy of eye drops “artificial tear with lysozyme”, conducted on a model of traumatic keratitis, showed the absence of an allergenic effect and the presence of effective anti-inflammatory and regenerative effect, which contributes to a more rapid elimination of inflammation and an acceleration of the process of epithelization of the damaged cornea as compared to the control.

Using the sodium salt of carboxymethyl cellulose as a matrix, immobilization of lysozyme and lysozyme with quercetin was conducted out by gel entrapment. It was shown, that in the mass ratios of lysozyme: quercetin: polymer (1: 0.4: 6), the complete inclusion of lysozyme and quercetin, preservation of the hydrolytic activity of the enzyme is observed. The resulting gel is mucoadhesive, because it has high adhesive properties to the mucosa (6000 Pa),

prolonged action. Immobilized lysozyme is active in a wide range of pH values, is stable in an acidic environment and during storage. The obtained mucoadhesive gel with immobilized lysozyme and quercetin is a preparation with complex biological activity and is promising for further biomedical research.

A method for cryoimmobilization of lysozyme into polyvinyl alcohol (M.m. 120 kDa) is proposed. Hydrogel coatings were obtained with quantitative retaining of protein and high hydrolytic activity of the enzyme. The drug has an widened pH profile of the hydrolytic activity of lysozyme in the acidic range, is stabilized in an acidic environment and retains 95% activity (3 months). The process of lysozyme exit from the cryogel occurs evenly - 50% in the first 30 minutes, 50% in the following, and due to the porous carrier morphology, it provides diffusion-free release into the environment. The immobilized lysozyme exhibits a pronounced bactericidal effect against the test strains of *Staphylococcus aureus* and bacteriostatic one against the test strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. It has been shown that immobilized lysozyme has anti-inflammatory and antidysbiotic effects on the inflammation of the mucous membranes of the oral cavity modeled by lipopolysaccharide.

By immobilization of lysozyme into a complex matrix based on gelatin and sodium salt of carboxymethyl cellulose, mucoadhesive filmic forms of directed prolonged action, long shelf life (3 years) was obtained. It should be noted the strong mucoadhesive properties of the resulting preparation, so the strength of its adhesion to the mucosa is 4380 Pa. If necessary, the strength of mucoadhesion can be enhanced or decreased by varying the weight ratio of the gelatin / sodium salt of carboxymethyl cellulose. Lysozyme included in the polymeric matrix, is stable after immobilization and sterilization by γ -radiation (28 kGy), due to the radioprotective effect of gelatin. The mucoadhesive properties are enhanced by the additional introduction of the sodium salt of carboxymethyl cellulose (4000 Pa). The obtained films with lysozyme are effective in the treatment of experimental

stomatitis in rats with a decrease in inflammation and markers of microbial contamination of the mucous membranes by 80.9% and 97.5%, respectively.

Thanking theoretical, technological and analytical studies, the developed composition of immobilized lysozyme and quercetin formed the basis for the creation of a therapeutic and prophylactic tablet preparation of combined action "Lysozyme FORTE" with prolonged antimicrobial, antioxidant, immunostimulating and capillary protective effects.

As a result of studies to determine the sensitivity of test strains recommended by the State Pharmacopoeia of Ukraine to the active ingredients of the tablet, the antimicrobial effect of lysozyme was established, which manifests itself to varying degrees and depends on the genus and strain of the microorganism. It was shown that the addition of chlorhexidine bigluconate in all cases (in relation to gram-negative, gram-positive bacteria and yeast-like fungi) helps to expand the spectrum of antimicrobial action of the enzyme; the introduction of ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt complexon into this composition is more pronounced in relation to gram-negative bacteria *E. coli* and yeast-like fungi *Candida albicans*.

The selected technology of wet granulation to obtain tablet masses of lysozyme and quercetin made it possible to obtain an immobilized preparation with preservation of hydrolytic activity and other physicochemical and biochemical properties of the enzyme. Methods for the quantitative analysis of the active components of the tablet mixture: lysozyme and quercetin are determined. Granules using the proposed four filler compositions, namely lactose monohydrate, mannitol, povidone K-17; lactose monohydrate, mannitol, caramellose; calcium citrate, starch, gelatin retain their physical, chemical and mechanical properties for 1 year in a hermetically sealed state at a temperature of 0-4 ° C.

The study of the antimicrobial and anti-inflammatory effects of tablet mixtures in experimental animals showed that the proposed composition, in which the enzyme is combined with quercetin and gelatin, increases the level of lysozyme

in the cheek mucosa by 2 times than the reference drug "Lizak". A similar pattern of changes is observed for the antioxidant-prooxidant index: its value increases by 1.7-fold in compared with Lizak tablets. As a result of a set of studies, the most promising composition with respect to maintaining bacteriolytic activity and therapeutic efficacy with lysozyme immobilized in gelatin, was introduced at Odessa Biotechnology NPA in the form of the "Lysozyme FORTE" dietary supplement (Technical regulations of Ukraine (TR U) 10.8-27420386-004: 2016).

An assessment of the kinetic parameters of lysozyme functioning after immobilization into gel, cryogel and polymeric films indicates the different effects of polymers on the catalytic activity of the enzyme (to a lesser extent gelatin, sodium salt of carboxymethyl cellulose and polyvinyl alcohol), which manifests itself in an increase in the Michaelis constant, maximum reaction rate and K_M / V_{\max} ratio, which is explained by transient activation of the enzyme.

In all cases, the methods of non-covalent immobilization into polymer matrices were selected and implemented that positively affect the functioning of lysozyme: they stabilize the enzyme molecule, contribute to the expansion of pH and thermal profile of activity, prolonged storage, and provide directed hydrolytic action on the mucous membranes due to the mucoadhesive properties of the polymers. At the same time, the immobilized enzyme is characterized by an antimicrobial, anti-inflammatory effect, which is proved by microbiological tests on models of traumatic keratitis, stomatitis and gingivitis. The use of modern analytical methods for monitoring the effectiveness of immobilization in work provides important information on the effect of this process on the stability and activity of the enzyme, and makes a significant contribution to the strategy of immobilization of lysozyme, including for the development of effective medical products.

Key words: biotechnology, lysozyme, mucoadhesive dosage forms, immobilization, polymers.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія:

1. Романовская И., Декина С., Андронати С. Конструирование иммобилизованных белковых веществ. – Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG., 2012. – 335 с. - *Здобувачем здійснено пошук джерел літератури, проаналізовано і виконано ряд досліджень, написана частина монографії.*

Статті у фахових закордонних виданнях:

2. Декина С.С., Демьяненко С.А., Левицкий А.П., Романовская И.И. Экспериментальная оценка противовоспалительного действия мукоадгезивных лечебных пленок с лизоцимом // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - № 8. – С. 39-42 (РИНЦ) – *Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.*
3. **Dekina S.S.**, Romanovskaya I.I., Ovsepyan A.M., Balashova M.V. Sterilization of ocular medical inserts with smmobilized proteins // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2015. – V.49 (4). – P.275-279 (Scopus, Web of Science) – *Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.*
4. **Dekina S.S.**, Romanovska I.I., Ovsepyan A.M., Tkach F.N. Development and characterization of mucoadhesive films with immobilized lysozyme // Carbohydrate Polymers. – 2016. – V. 147. – P. 208–215 (Scopus, Web of Science) – *Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.*

5. Romanovskaya I.I., **Dekina S.S.**, Sotnikova E.P., Abramova A.B. Preparation and properties of lysozyme-containing eye drops for tear-substitutive therapy // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2019. – V.53, №8.- P. 755-758 (Scopus, Web of Science) (Scopus, Web of Science) - *Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.*

Статті у вітчизняних фахових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами:

6. **Декина С.С.**, Романовская И.И., Громовой Т.Ю. Влияние полимеров на процессы ассоциации молекул лизоцима // Biopolymers and cells. – 2011. – V. 27, № 6. – P. 442-445 (Scopus, Web of Science) – *Здобувачем здійснено пошук літератури, підготовлені зразки для проведення досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, підготовлена стаття до публікації.*

7. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М, Артеменко А.Г., Романовська І.І., Кузьмін В.Є. Дослідження впливу іонів металів на активність лізоциму методом QSAR аналізу// Мікробіологія і біотехнологія.-2012.- №4 (20).- С. 44-50 (Index Copernicus, CiteFactor, Advanced Sciences Index та ін.). - *Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.*

8. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Леоненко І.І., Єгорова А.В. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом: отримання, властивості // Biotechnologia Acta. – 2015. -Т. 8, № 3. – С. 104-109 (Open Academic Journals Index, Index Copernicus та ін.) - *Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.*

9. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Левицький А.П. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. - №3. – С. 30-40 (Index Copernicus,

CiteFactor, Advanced Sciences Index та ін.) - Здобувачем здійснено пошук літератури, підготовлені зразки для проведення досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, підготовлена стаття до публікації.

10. **Dekina S.S.**, Romanovska I.I., Ovsepyan A.M., Bodyul M.G., Toptikov V.A. Isolation and purification of lysozyme from the hen egg white // Biotechnologia Acta – 2015.-V. 8, № 6.- P.41-47. (Open Academic Journals Index, Index Copernicus та ін.). - Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.

11. **Декина С.С.**, Романовская И.И., Овсебян А.М., Молодая А.Л., Пашкин И.И. Имобилизация лизоцима в криогель поливинилового спирта // Biotechnologia Acta – 2014. - Т.7, № 3. - С. 69-73. (Open Academic Journals Index, Index Copernicus та ін.). – Здобувачем здійснено пошук літератури, підготовлені зразки для проведення досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, підготовлена стаття до публікації.

12. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Псахіс І.Й., Псахіс Б.Й. Дослідження чутливості мікроорганізмів до комбінацій лізоциму з лікарськими речовинами. // Медична та клінічна хімія. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 68-70 (Index Copernicus, Bielefeld Academic Search Engine) – Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.

13. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Севаст'янов О.В., Рогожа Є.О. Таблеткові суміші, що містять іммобілізований лізоцим і кверцетин: отримання, властивості // Медична та клінічна хімія. – 2017. – Т.19, № 2. – С. 19-24 (Index Copernicus, Bielefeld Academic Search Engine) - Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.

14. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Шестеренко Ю.А., Сотнікова О.П., Абрамова А.Б., Осташевський В.Л. Лізоцимвмісний препарат для

сльозозамінної терапії: фармакотерапевтична ефективність // Медична та клінічна хімія.- 2018. –Т. 20, № 2. – С. 100-104 (Index Copernicus, Bielefeld Academic Search Engine) - *Здобувачем виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації.*

Статті у вітчизняних фахових виданнях:

15. **Декіна С.С.**, Левицький А.П., Романовська І.І., Дем'яненко С.О. Протизапальна дія мукоадгезивних плівок з іммобілізованим лізоцимом на слизову оболонку щоки щурів // Одеський медичний журн. -2011. - № 4. – С. 7-9. - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

16. Романовська І.І., Сотникова О.П., **Декіна С.С.**, Шестеренко Є.А.. Фізико-хімічні властивості і офтальмонешкідливість очної лікарської мазі з лізоцимом // Медична хімія.- 2012 - Т.14, №3(52).-С.52-55. - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

17. Левицький А.П., Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Томіліна Т.В., Хромагіна Л.М., Кнава О.Е. Лікувально – профілактична дія мукоадгезивних плівок з лізоцимом на слизову оболонку порожнини рота після аплікації ліпополісахариду // Одеський медичний журнал.-2014.- № 4 (144). – С. 9-13. - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

18. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Сотнікова О.П. Лізоцимвмісний препарат "штучна сльоза": отримання, властивості // Мікробіологія і біотехнологія. - 2015. -№ 4(32). – С.46-52. - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

19. Sevastyanov O., Romanovska I., **Dekina S.** Features of the hydrolysis kinetics of *Micrococcus lysodeikticus* by immobilized lysozyme // Innov Biosyst Bioeng. –

2020. - №1(4) - Р. 45–50. - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

20. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Севастьянов О.В., Мальцев Г.В. Аналіз компонентів таблеткових сумішей з іммобілізованим лізоцимом // Мікробіологія і біотехнологія. - 2020. -№ 1(48). – С. 32-47 - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

Статті в інших наукових виданнях:

21. **Декіна С.С.**, Успенський О.Є, Гінжол І.В., Остафійчук М.О., Левицький А.П.. Вплив оральних аплікацій лізоцимвмісних гелів на стан слизової оболонки щурів після дії ліпополісахариду // Вісник стоматології. – 2016. - № 3. - С. 13-17 - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

22. **Декина С.С.**, Успенский О.Е., Селиванская И.А., Хромагина Л.Н. Профилактическое действие на десну крыс фитогеля «Лизоцим-форте» при индометациновой интоксикации // Вісник стоматології. - 2019. - №2 (107). – С.14-18. - *Здобувачем організовані та проведені експерименти, узагальнені результати, підготовлено статтю до публікації.*

Патенти України на винахід і на корисну модель:

23. Патент України на корисну модель № 72476. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 8/02 (2006.01), А61К 8/64 (2006.01), А61К 8/65 (2006.01) / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 27.08.2012. Бюл. № 16. - *Здобувачем складено опис та формули патентів, теоретично обґрунтовані запропоновані рішення.*

24. Патент України на винахід 99899. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 9/38 (2006.01), А61К 9/40

(2006.01), A61K 38/47 (2006.01), A61P 31/00 / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 10.10.2012. Бюл. № 19. - *Здобувачем складено опис та формули патентів, теоретично обґрунтовані запропоновані рішення.*

25. Патент України на корисну модель 102170. Антимікробний мукоадгезивний матеріал. МПК A61K 38/46 (2006.01), A61K 31/194 (2006.01), A61K 31/79 (2006.01) / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Овсепян А.М. Опубл. 26.10.2015. Бюл. № 20. - *Здобувачем складено опис та формули патентів, теоретично обґрунтовані запропоновані рішення.*

26. Патент України на корисну модель 136449. Поліфункціональний антидисбіотичний засіб «Лізоцим-Форте». МПК (2019.01) A61K 31/00, A61P 1/00 / Левицький А.П., Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Остафійчук М.О., Бочаров А.В., Фурдичко А.І., Петренко О.А., Борис Г.З. Опубл. 27.08.2019. Бюл. № 16. - *Здобувачем складено опис та формули патентів, теоретично обґрунтовані запропоновані рішення.*

Матеріали наукових конференцій, конгресів, симпозіумів та з'їздів:

27. **Декина С.С.** Исследование поведения молекул лизоцима при иммобилизации в растворы полимеров // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 9-13 апреля 2012 г.) - С. 1-2. – *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

28. **Декина С.С.**, Овсепян А.М. Мукоадгезивные полимерные пленки с иммобилизованным лизоцимом. XIV Конференція молодих учених та студентів-хіміків Південного регіону України (Одеса, 25-27 квітня 2012). – С. 47. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

29. Декина С.С., Чернецкая С.В., Слончак В.С., Овсепян А.М. Исследование иммобилизации лизоцима в криогель поливинилового спирта // Матеріали науково-практичної конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології і ароматології» (20 вересня 2013, Одеса). – С. 16-20. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

30. Декина С.С., Овсепян А.М. Изучение стерилизации иммобилизованных белковых препаратов – перспективных лекарственных средств // XX Международная конференция «Ломоносов 2013» (8-13 апреля 2013, Москва). – С. 1-2 . - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

31. Декина С.С., Овсепян А.М., Чернецкая С.В., Слончак В.С. Выделение и частичная очистка лизоцима из белка куриных яиц // XVI Конференция молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28-30 апреля 2014, Одесса). – С. 48. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

32. Декина С.С., Романовская И.И., Овсепян А.М., Левицкий А.П. Лизоцимсодержащие полимерные мукоадгезивные пленки // XI Украинский биохимический конгресс (Киев, 6-10 октября 2014). – С. 163. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

33. Декіна С.С., Овсепян А.М., Романовська І.І. Розробка мукоадгезивного гелю бактеріолітичної дії // Мат. IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 16-17 жовтня 2014). – С. 215-216. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

34. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Бодюл М.Г. Виділення і очищення лізоциму з білка курячого яйця. // Тези доп. конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня 2015). – С. 22. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*
35. Овсепян А.М., **Декина С.С.** Мукоадгезивный гель с иммобилизованными лизоцимом и кверцетином // Мат. XVII Конференции молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28 апреля – 1 мая 2015, Одесса). – С. 12. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*
36. Ovsepyan A., **Dekina S.** Sterilization methods for medicinal films with immobilized proteins // International Conference for Young Scientists "Actual Problems of Microbiology and Biotechnology" (Odesa, 1-4 June, 2015). – P. 8 - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*
37. Овсепян А.М., **Декіна С.С.** Вплив полімерів на кінетичні параметри лізоциму // Тези доп. конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016» (Київ, 26-27 травня 2016). – С. 36 . – *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*
38. Романовская И.И., **Декина С.С.**, Сотникова Е.П. Лизоцимсодержащий препарат для слезозаменительной терапии: получение, физико-химические свойства. // Мат. науково-практичної конф. офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» (19-20 травня 2016, Одеса). - С. 208. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*
39. Овсепян А.М., **Декина С.С.** Разработка метода выделения высокоочищенного лизоцима из белка куриных яиц // Тез. доп. XVIII

Наукової молодіжної конференції «Проблеми та досягнення сучасної хімії» (17-20 травня, Одеса). – 2016. – С. 71. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

40. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Овсепян А.М., Сотнікова О.П., Левицький А.П. Мукоадгезивні лікарські форми лізоциму // Мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016). –С. 344. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

41. **Декина С.С.**, Рогожа Е.А. Разработка и исследование таблетированной формы лизоцима и кверцетина // Мат. XIX наукової молодіжної конференції «Проблеми і досягнення сучасної хімії» (26-28 квітня 2017, Одеса) - С. 33. - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

42. Shesterenko Y., **Dekina S.**, Romanovska I., Sevastyanov O. Polymeric materials with hydrolytic activity. // International conference on biomaterials and biosensors “4th BIOMATSEN 2019” (Mugla, Turkey, 12-18 May 2019). - Р. 128 - *Здобувачем розроблена методологія і проведені дослідження, обґрунтовані та узагальнені результати досліджень, написані тези доповіді.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	29
ВСТУП.....	31
РОЗДІЛ 1. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЛІЗОЦИМУ НА ПОЛІМЕРНИХ НОСІЯХ, ВИКОРИСТАННЯ В МЕДИЦИНІ	40
1.1 Лізоцим: структура, механізм дії, застосування в медицині.....	40
1.2 Біотехнологія іммобілізації лізоциму.....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ЕКСПЕРИМЕНТУ	72
2.1 Матеріали і прилади, використані для дослідження.....	72
2.2 Визначення білка.....	74
2.3 Визначення гідролітичної активності лізоциму.....	75
2.4 Виділення і очищення лізоциму з білка курячих яєць.....	76
2.5 Гель-хроматографія виділеного лізоциму.....	76
2.6 Визначення білково-фракційного складу ензиму методом електрофорезу в поліакриламідному гелі.....	77
2.7 QSPR - аналіз впливу іонів металів на активність лізоциму.....	77
2.8 Оцінка взаємодії лізоциму з полімерами методом матрично активованої лазерної десорбції / іонізації.....	78
2.9 Вивчення гідролітичної активності лізоциму в присутності динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти.....	79
2.10 Визначення кверцетину.....	79
2.11 Визначення біглюконату хлоргексидина.....	80
2.12 Виготовлення препарату «штучна сльоза» з лізоцимом.....	80

2.13 Імобілізація лізоциму включенням в гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози.....	81
2.14 Включення лізоциму в ліпофільну мазеву основу.....	81
2.15 Імобілізація лізоциму шляхом включення в гель желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з наступним отриманням плівок.....	82
2.16 Кріоімобілізація лізоциму в полівініловий спирт.....	82
2.17 Визначення в'язкості розчинів полімерів.....	83
2.18 Визначення величини мукоадгезії полімерних форм іммобілізованого лізоциму.....	83
2.19 Визначення фізико-хімічних характеристик вільного і іммобілізованих препаратів лізоциму.....	84
2.20 Визначення кінетичних параметрів вільного і іммобілізованого лізоциму.....	85
2.21 Технологія вологого гранулювання.....	85
2.22 Визначення активності еластази.....	86
2.23 Визначення активності уреазы.....	87
2.24 Визначення концентрації малонового діальдегіду.....	87
2.25 Визначення гіалуронової кислоти.....	88
2.26 Визначення чутливості мікроорганізмів до діючих компонентів таблетних сумішей.....	89
2.27 Оцінка антимікробної дії різних форм іммобілізованого лізоциму.....	89
2.28 Вивчення офтальмонешкідливості лізоцимвмісних очних крапель.....	90
2.29 Вивчення фармакотерапевтичної ефективності очних крапель «штучна сльоза» на моделі травматичного кератиту.....	90
2.30 Оцінка біологічної дії мукоадгезивного гелю з лізоцимом і кверцетином на основі Na-КМЦ.....	92

2.31 Оцінка біологічної дії лізоциму, іммобілізованого в кріогель полівінілового спирту.....	92
2.32 Оцінка біологічної дії мукоадгезивної плівкової форми іммобілізованого лізоциму.....	93
2.33 Оцінка біологічної дії таблетованих сумішей з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином.....	94
2.34 Статистична обробка експериментальних даних.....	95
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІЗОЦИМУ З БІЛКА КУРЯЧИХ ЯЄЦЬ.....	96
3.1 Розробка способу виділення високоочищеного лізоциму з білка курячих яєць.....	97
3.2 Дослідження впливу іонів лужних, лужноземельних і перехідних металів на гідролітичну активність лізоциму.....	104
3.3 Дослідження синергітичного ефекту лізоциму з протеазами і динатрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти.....	109
РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА МУКОАДГЕЗИВНИХ ЛІЗОЦИМ- ПОЛІМЕРНИХ СИСТЕМ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ.....	114
4.1 Дослідження взаємодії лізоциму з розчинами полімерів природного і синтетичного походження.....	114
4.2 Розробка препарату «штучна сльоза» з лізоцимом.....	123
4.2.1 Стабілізація лізоциму розчинами полімерів і дослідження його фізико-хімічних і біохімічних властивостей.....	125
4.2.2. Вивчення офтальмонешкідливості і фармакотерапевтичної ефективності очних крапель «штучна сльоза з лізоцимом» на моделі травматичного кератиту.....	133
4.3 Розробка мукоадгезивного гелю натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з іммобілізованим лізоцимом.....	137

лізоцимом і кверцетином.....	
4.3.1 Імобілізація лізоциму і кверцетину в гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і дослідження їх властивостей.....	138
4.3.2 Дослідження мукоадгезії гелю з іммобілізованим лізоцимом.....	145
4.3.3 Експериментальна оцінка лікувально-профілактичної дії гелів з лізоцимом, лізоцимом і кверцетином.....	148
4.4 Включення лізоциму в ліпофільну мазеву основу.....	150
4.5 Кріоімобілізація лізоциму в полівініловий спирт.....	153
4.5.1 Імобілізація лізоциму в кріогель полівінілового спирту та дослідження його властивостей.....	154
4.5.2 Дослідження антимікробної дії кріогелю з іммобілізованим лізоцимом.....	160
4.5.3 Дослідження лікувально-профілактичної дії кріогелю з лізоцимом.....	161
4.6 Розробка мукоадгезивних плівкових форм іммобілізованого лізоциму.....	166
4.6.1 Імобілізація лізоциму в полімерну матрицю на основі желатину і Na–КМЦ.....	166
4.6.2 Дослідження стерилізації γ -опроміненням мукоадгезивних плівок з іммобілізованим лізоцимом.....	174
4.6.3 Дослідження антимікробної дії мукоадгезивних лікарських плівок з лізоцимом.....	175
4.6.4 Експериментальна оцінка біодоступності і протизапальної дії МАП з іммобілізованим лізоцимом.....	177
ГЛАВА 5. БІОТЕХНОЛОГІЯ СТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСНОГО АНТИБАКТЕРІАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ СУБЛІНГВАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ.....	184

5.1 Дослідження впливу полімерів на активність лізоциму і вміст компонентів таблетки.....	186
5.2 Вивчення антимікробної активності діючих речовин таблетки.....	188
5.3 Вивчення технологічних характеристик субстанцій і вибір складу допоміжних речовин.....	192
5.4 Розробка методів аналізу компонентів таблеткових сумішей.....	199
5.5 Дослідження дії таблетної суміші з іммобілізованим лізоцимом, на тканини порожнини рота щурів після аплікації гелю ліпополісахариду.....	212
РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ВІЛЬНОГО І ІММОБІЛІЗОВАНОГО ЛІЗОЦИМУ.....	222
ВИСНОВКИ.....	228
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	230
ДОДАТКИ.....	255

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АПІ - антиоксидантно-прооксидантний індекс

БАР – біологічно активні речовини

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ВООЗ- Всесвітня організація охорони здоров'я

ГПМЦ – гідроксипропілметилцелюлоза

д.з.з.р. - діаметр зони затримки росту

ДФУ – Державна фармакопея України

ЛПС – ліпополісахарид

ЛР – лікарські речовини

КГПВС – кріогель полівінілового спирту

М.м. – молекулярна маса

МАЛДІ /MALDI– метод матрично активованої лазерної десорбції/ іонізації в польоті

МАП – мукоадгезивна плівка

МДА – малоновий діальдегід

м/о - мікроорганізм

ПААГ – поліакриламідний гель

ПВС – полівініловий спирт

ПВП- полівінілпіролідон

СОПР – слизова оболонка порожнини рота

ССО – синдром сухого ока

ХГБГ - хлоргексидину біглюконат

ВOC - Nt - ВOC-L-аланін- n-нітрофеніловий ефір)

GEWL – лізоцим гусячого типу

HEWL – лізоцим курячого типу

Na₂ЕДТА – динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти

Na-КМЦ-натрієва сіль карбоксиметилцелюлози

NAG – N-ацетилглюкозамін

NAM - N-ацетилмурамова кислота

PLS – метод часткових найменших квадратів

SDS- sodium dodecyl sulfate (додецил сульфат натрію)

TJL- лізоцим безхребетних

QSAR - Quantitative Structure Activity Relationship

QSPR - Quantitative Structure Property Relationship

ВСТУП

Актуальність теми. На рубежі XX-XXI століть резистентність збудників бактеріальних захворювань до лікувальних препаратів призводить до різкого зниження ефективності етіотропної терапії інфекційних хвороб [1-3]. У травні 2015 р. Всесвітня асамблея охорони здоров'я затвердила Глобальний план дій щодо стійкості до протимікробних препаратів. Урядом України затверджено Національний план дій щодо боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів, до складу якого входить посилення наукових досліджень щодо антибіотикорезистентності (Розпорядження № 116-р від 6 березня 2019 р.). Тому пошук і створення нових антибактеріальних препаратів з використанням природних біологічно активних агентів є пріоритетним напрямом досліджень. До природних антибіотиків належить лізоцим (КФ 3.2.1.17) – гідролітичний ензим, що руйнує клітинну стінку бактерій за рахунок гідролізу β -1,4 -зв'язків між залишками N-ацетилмурамової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміну в складі пептидоглікану і між залишками N-ацетил-D-глюкозаміну в складі хітодекстрину [4]. Сучасні біотехнологічні методи створення нових іммобілізованих форм ензимів відкривають широкі можливості їх застосування в медицині, харчовій і фармацевтичній та інших галузях промисловості [5-9].

У медицині застосовують розчини лізоциму при лікуванні хронічних септичних станів і гнійних процесів, при опіках, обмороженнях, кон'юнктивітах, ерозії рогівки ока, стоматиті та інших інфекційних захворюваннях. Відсутність нових ефективних лікарських форм лізоциму поряд з необхідністю заміни в можливих випадках антибіотиків визначає актуальність досліджень в сфері медичної біотехнології - іммобілізації з використанням мукоадгезивних полімерних матриць медичного призначення для отримання стабільних високоактивних лікарських форм (розчинів, гелів,

нерозчинних гідрогелевих покриттів, плівкових форм і таблеток) пролонгованої дії для нанесення на слизову оболонку. Їх перевагами перед розчинами ензиму є точність дозування, підвищена біодоступність, стабільність, сайт-специфічне введення, тривалість дії, зручність застосування [5, 10-12]. Перспективне використання в таких дослідженнях лізоциму, виділеного економічним методом. Крім того, вкрай актуальним є вирішення проблеми розширення антимікробної дії лізоциму на грамнегативні бактерії і гриби поряд з підвищенням його гідролітичної активності [13-15].

Розробка полімерних форм іммобілізованого лізоциму представляє як теоретичний, так і практичний інтерес, доповнюючи знання в галузі біотехнології, біоорганічної, фармацевтичної хімії про властивості матриць, продуктів і характер взаємодії ензим-носій, фізико-хімічні і медико-біологічні властивості та їх функціонування як потенційних лікарських засобів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт в лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України в період 2010-2019 рр. за наступними темами: «Мукоадгезивні полімерні системи пролонгованої антибактеріальної дії з іммобілізованим лізоцимом» (2012 - 2014 рр., № держ. реєстрації 0113U001342), «Розробка нових лізоцим-полімерних систем антимікробної і протизапальної дії - перспективних препаратів топічного способу введення» (2014- 2015 рр., № держ. реєстрації 0114U002201), «Фізико-хімічні основи створення комплексного антибактеріального препарату сублінгвального застосування» (2015-2016 рр., № держ. реєстрації 0115U002148) та «Біотехнологія створення комплексного антибактеріального препарату для сльозозамінної терапії »(2017-2018 рр., № держ. реєстрації 0117U003067).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи - теоретичне і експериментальне обґрунтування біотехнології отримання нових мукоадгезивних лізоцим-полімерних систем для розробки ефективних стабільних ензимних препаратів антибактеріальної дії.

Відповідно до поставленої мети основними завданнями роботи були наступні:

1. Удосконалити спосіб виділення лізоциму з протеїну курячого яйця і встановити біохімічні та фізико-хімічні властивості отриманого ензиму (вивільнення білка, гідролітична активність, гомогенність, білково-фракційний склад, рН- і температурний оптимуми, строки зберігання).

2. Знайти шляхи збільшення гідролітичної активності лізоциму і спектра його антимікробної дії; дослідити вплив іонів лужних, лужноземельних і перехідних металів на гідролітичну активність отриманого ензиму в умовах, наближених до фізіологічних.

3. Встановити наявність взаємодії лізоциму з розчинами полімерів природного і синтетичного походження; розробити хімічні і фізичні способи іммобілізації лізоциму з використанням полімерів або комплексних полімерних матриць, що дозволять отримувати різні форми іммобілізованих препаратів: розчини, гелі, плівки, таблетки пролонгованої антибактеріальної дії.

4. Визначити ефективність іммобілізації (вміст білка і збереження гідролітичної активності отриманих препаратів лізоциму), дослідити фізико-хімічні властивості іммобілізованих препаратів (рН- і термозалежності, рН- і термостабільність гідролітичної активності, біокінетика і ін.).

5. Здійснити медико-біологічну перевірку отриманих іммобілізованих форм лізоциму.

Об'єкт дослідження - біотехнологія іммобілізації лізоциму з білка курячого яйця на полімерних носіях.

Предмет дослідження - фізико-хімічні, біохімічні та біологічні властивості вільного і іммобілізованого в полімерні носії лізоциму білка курячого яйця.

Методи дослідження – комплекс біохімічних, фізико-хімічних методів (УФ-спектроскопія, люмінесцентний аналіз, мас-спектрометрія MALDI, електрофорез в ПААГ, віскозиметрія) - для дослідження функціонування вільного і іммобілізованого ензиму; морфологічних (скануюча електронна мікроскопія) - для оцінки якості препаратів і їх ефективності в біологічних дослідженнях; методів регресійного аналізу, часткових найменших квадратів (PLS) - для побудови залежності структура - властивість / реакційна здатність (QSAR/QSPR); технологічних - для розробки біотехнології отримання, документації різних форм іммобілізованого лізоциму.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено наукові основи біотехнології конструювання мукоадгезивних лізоцим-полімерних систем шляхом регулювання складу, активності, стабільності і пролонгування їх комплексів з природними і синтетичними полімерними матрицями за рахунок іонних, водневих і міжмолекулярних нековалентних взаємодій. Вперше запропонована концепція поведінки макромолекул лізоциму в розчинах полімерів при їх іммобілізації різними методами.

Встановлено гомогенність, фракційно-білковий склад і активність лізоциму протеїну курячого яйця, виділеного за модифікованим методом В.Я. Мікельсона.

Методом QSAR аналізу вперше отримано трьохпараметрову модель з використанням ентропії, ентальпії іонів металів, а також електронегативності за Полінгом як дескрипторів, що описує інгібуючий вплив широкого набору іонів металів на гідролітичну активність лізоциму.

Визначені підходи до стабілізації та пролонгування гідролітичної дії лізоциму, в тому числі на слизових оболонках, шляхом використання

полімерів різної мукоадгезивної сили (натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, желатин, полівініловий спирт та ін.)

Розроблені біотехнології іммобілізації лізоциму з використанням природних і синтетичних носіїв, хімічними і фізичними методами, що дозволяють отримувати різні форми ензиму з високою гідролітичною активністю, тривалого строку зберігання.

Встановлено антимікробну, протизапальну дію мукоадгезивних очних крапель, гелів, кріогелю, плівок і таблеток з іммобілізованим лізоцимом в мікробіологічних випробуваннях, а також на моделях травматичного кератиту, стоматиту і гінгівіту. Зміна кінетичних параметрів функціонування лізоциму після іммобілізації свідчить про вплив полімерів (желатину в меншій мірі, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту), що проявляється в збільшенні константи Міхаеліса, максимальної швидкості реакції і відношення $K_M/V_{\text{макс}}$, що пояснюється перехідною активацією ферменту.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано модифікацію методу виділення лізоциму з білка курячого яйця, що дозволяє отримувати в кристалічному вигляді в лабораторних умовах стабільний активний ензим, що відрізняється високим ступенем чистоти, перспективний для використання в біотехнологічних і біомедичних цілях.

Отримана методом QSAR аналізу трьохпараметрова модель, що включає наступні дескриптори: електронегативність за Полінгом, ентропію і ентальпію іонів металів (лужних, лужноземельних і перехідних), дозволяє прогнозувати з високим ступенем вірогідності гідролітичну активність лізоциму в присутності іонів металів у водному розчині.

Розроблено ефективні біотехнологічні способи хімічної і фізичної стабілізації та іммобілізації лізоциму з використанням полімерів природного і синтетичного походження. Отримано мукоадгезивні очні краплі на основі декстрану та гідроксипропілметилцелюлози, що відповідають вимогам

Державної Фармакопеї України; гелі на основі натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з кверцетином, гідрогелеві покриття на основі кріогелю полівінілового спирту, полімерні плівки на основі желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і таблеткові суміші. Отримані біотехнологічні продукти з лізоцимом, іммобілізованим в різні полімерні матриці, характеризуються високими рівнями білку і гідролітичної активності, пролонгованою дією, тривалим строком зберігання, перспективні для застосування в офтальмології та стоматології як лікувально-профілактичні засоби. Іммобілізовані в желатин лізоцим і кверцетин (діючі речовини) входять до складу біологічно-активної добавки «Лізоцим-ФОРТЕ», впровадженої на НВА «Одеська біотехнологія» (Технічні умови України (ТУ У) 10.8-27420386-004: 2016).

Особистий внесок автора полягає в плануванні та підготовці дисертаційної роботи. Автором самостійно обґрунтовані тема і концепція дисертаційної роботи, проведено пошук і аналіз літератури, постановка задач, розроблені схема і методологія експериментальних досліджень, проведено статистичний аналіз і інтерпретацію отриманих результатів, підготовлені до друку публікації за темою роботи.

Викладені в дисертації результати експериментальних досліджень отримані при безпосередній участі автора або під його керівництвом. Співвиконавці проведених досліджень наводяться в співавторах відповідних наукових публікацій.

Формулювання теми, основних положень і висновків проведені спільно з науковим консультантом професором, д.б.н. Іриною Ігорівною Романовською. У розробці методів іммобілізації лізоциму, дослідженні фізико-хімічних, біохімічних і кінетичних особливостей функціонування отриманих препаратів брали безпосередню участь інж. Овсепян А.М., с.н.с., к.х.н. Севастьянов О.В. (співробітники лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В.

Богатського НАН України, де працює здобувач). Електрофоретичні дослідження проведені на кафедрі генетики біологічного факультету ОНУ імені І.І. Мечникова спільно з к.б.н., доц. Топтіковим В.А.

Медико-біологічні та мікробіологічні дослідження іммобілізованих препаратів лізоциму проведені в ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» спільно з зав. лаб. фармакології і тканинної терапії, д.м.н., проф. Сотниковою О.П., зав. лаб. мікробіології Молодою А.Л., в ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» спільно з чл.-кор. УААН, д.б.н., проф. Левицьким А.П., в НТІЦ «Водообробка» спільно з Псахіс Б.Й., Псахіс І.Б.

QSAR аналіз впливу іонів металів на гідролітичну активність лізоциму проведено спільно з зав. відділом молекулярної структури і хемоінформатики, чл.-кор. НАН України, д.х.н., проф. Кузьмінім В.Є і с.н.с., к.х.н. Артеменко А.Г. Мас-спектрометричні дослідження проведені в Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України спільно з к.х.н., с.н.с. Громовим Т.Ю. Результати скануючої електронної мікроскопії отримані і інтерпретовані за участю д.ф.-м.н., проф. Ткача В.Ф. в Інституті надтвердих матеріалів імені В.М. Бакуля НАН України.

Особистий внесок автора підтверджується представленими документами і науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладені в дисертаційній роботі, доповідалися і обговорювалися на засіданні Вченої ради Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України (2018 г.), а також були представлені на міжнародних і українських наукових конференціях і симпозіумах, серед яких XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 9-13 апреля 2012 г.); XIV Конференція молодих учених та студентів-хіміків Південного регіону України (Одеса, 25-27 квітня 2012); Науково-практична конференція «Сучасні проблеми фармакології,

косметології і аромології» (20 вересня 2013, Одеса); XX Международная конференция «Ломоносов 2013» (8-13 апреля 2013, Москва); XVI Конференция молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28-30 апреля 2014, Одесса); XI Украинский биохимический конгресс (Киев, 6-10 октября 2014); IV Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 16-17 жовтня 2014); конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня 2015); XVII Конференция молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28 апреля – 1 мая 2015, Одесса); International Conference for Young Scientists "Actual Problems of Microbiology and Biotechnology" (Odesa, 1-4 June, 2015); Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016» (Київ, 26-27 травня 2016); Науково-практична конференція офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» (19-20 травня 2016, Одеса); XVIII Наукова молодіжна конференція «Проблеми та досягнення сучасної хімії» (17-20 травня, Одеса); VIII Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016); XIX Наукова молодіжна конференція «Проблеми і досягнення сучасної хімії» (26-28 квітня 2017, Одеса); International conference on biomaterials and biosensors "4th BIOMATSEN 2019" (Mugla, Turkey, 12-18 May 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 42 наукові праці, у тому числі 1 монографія, 19 статей у наукових фахових виданнях (з них 4 статті у виданнях іноземних держав, 15 у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз, 2 роботи в інших виданнях), 1 патент на винахід, 3 патенти на корисну модель, 16 тез доповідей в збірниках матеріалів конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), матеріалів і методів експерименту (розділ 2), результатів, їх обговорення (розділи 3, 4, 5, 6), висновків, списку цитованої літератури (257 джерел) і 4 додатків. Робота викладена на 265 сторінках комп'ютерного тексту, містить 75 таблиць і 99 рисунків.

РОЗДІЛ 1

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЛІЗОЦИМУ НА ПОЛІМЕРНИХ НОСІЯХ, ВИКОРИСТАННЯ В МЕДИЦИНІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Лізоцим: структура, механізм дії, застосування в медицині

Лізоцим (мурамідаза, КФ 3.2.1.17) - «зелений» антибактеріальний агент і найбільш вивчений представник бактеріолітичних ферментів, роль яких полягає в деградації бактеріальної клітинної стінки, був відкритий Олександром Флемінгом в 1922 р. [16]. Ензим присутній у тварин і людини в слині, слюзах, тканинах серця, лімфатичних вузлах, нирках, легенях, в хрящах, в навколоплідних водах (в тому числі в яєчному білку птахів), в меншій кількості - в скелетних м'язах і в мозку. Його виявляють в материнському молоці, кишковому слизі, плевральній рідині, мокротинні, дуоденальному соці, в лейкоцитах, сальниках, екстрактах кишківника, підшлункової залози і мозкових оболонках. Фермент присутній у комах, рослин, бактерій, нижчих грибів, найпростіших і вірусів [4].

Ензим, виділений з різних джерел, помітно відрізняється за своїми властивостями. Так, через широку варіабельність за походженням, структурними відмінностями, антигенними, хімічними і ферментативними властивостями молекул лізоциму, вони були класифіковані за різними класами / типами. Наприклад, субстратом лізоциму у бактерій є не тільки сополімер N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, але і олігосахариди з тією ж структурою, і навіть полімери, що містять тільки N-ацетилглюкозамін.

У царстві тварин були ідентифіковані три основних типи лізоциму: *c*-тип (курячий тип HEWL), *g*-тип (гусячий тип GEWL) та *i*-тип (тип безхребетних TjL) . Дослідження філогенетичного розподілу цих типів лізоциму виявило, що лізоцим *c*-типу переважно присутній у представників

хордових і у деяких двостулкових молюсків, що відносяться до безхребетних [17].

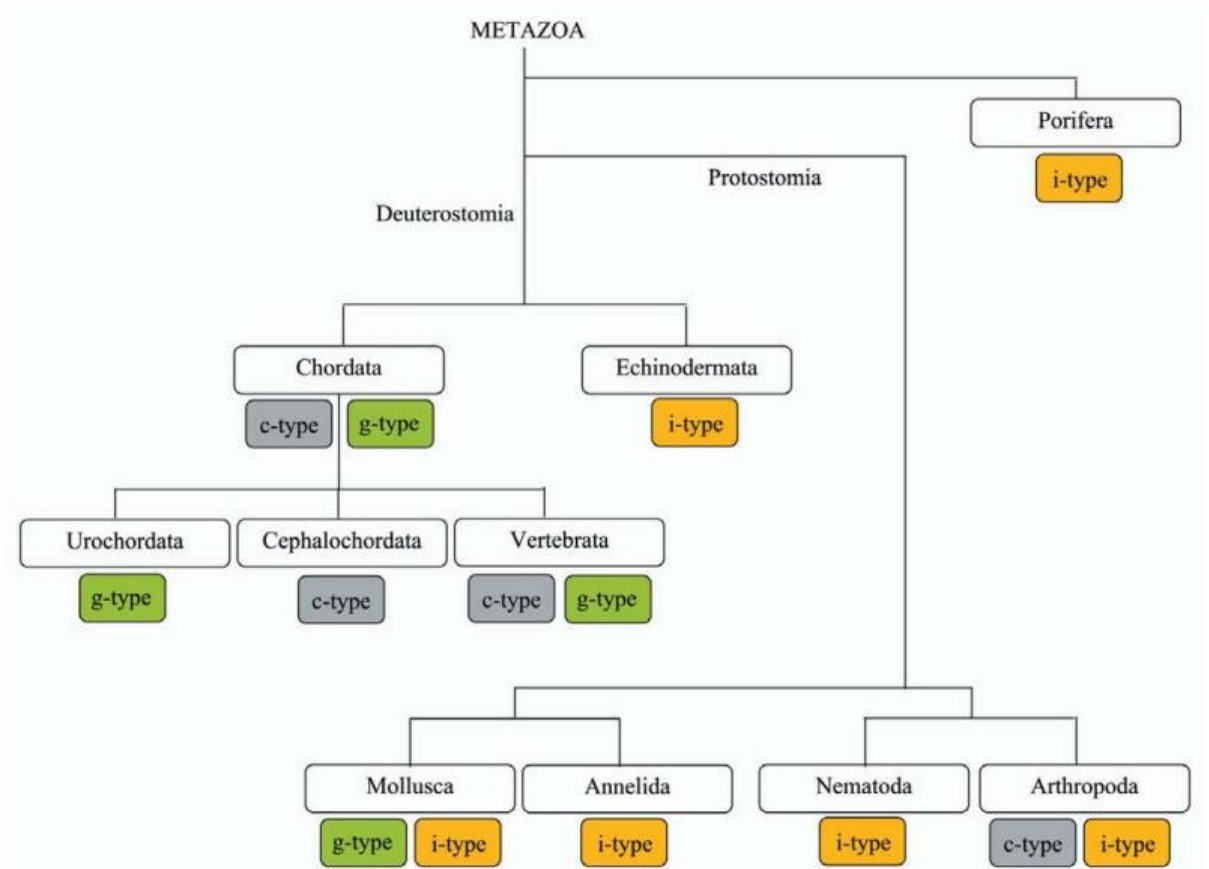


Рис.1.1. Розподіл різних типів лізоциму в тваринному світі. Спрощена структура кладограми [18]. Показані тільки гілки видів, що містять лізоцим.

Тривимірна структура лізоциму.

Незважаючи на певні відмінності в первинній структурі представників цих трьох типів лізоциму, їх тривимірні структури показали подібність (рис. 1.2). Однак існують деякі варіації в їх каталітичних механізмах і геномній організації генів.

Першим ензимом з встановленою методом рентгенівської кристалографією тривимірною структурою був лізоцим *c*-типу [19]. Він розділений на два домени глибокою щілиною, що містить активний центр.

Один з доменів переважно містить β -складчасту структуру, в той час як інший домен за своєю природою є спіральним.

Третинне згортання лізоциму *g*-типу аналогічно α/β структурі з вираженою щілиною активного центру [20]. Структурні порівняння TJL і HEWL доводять, що третинна структура TJL характеризується шістьма спіралями, одним β -лишком і великою щілиною для зв'язування субстрату і аналогічна загальній структурі HEWL (рис 1.2).

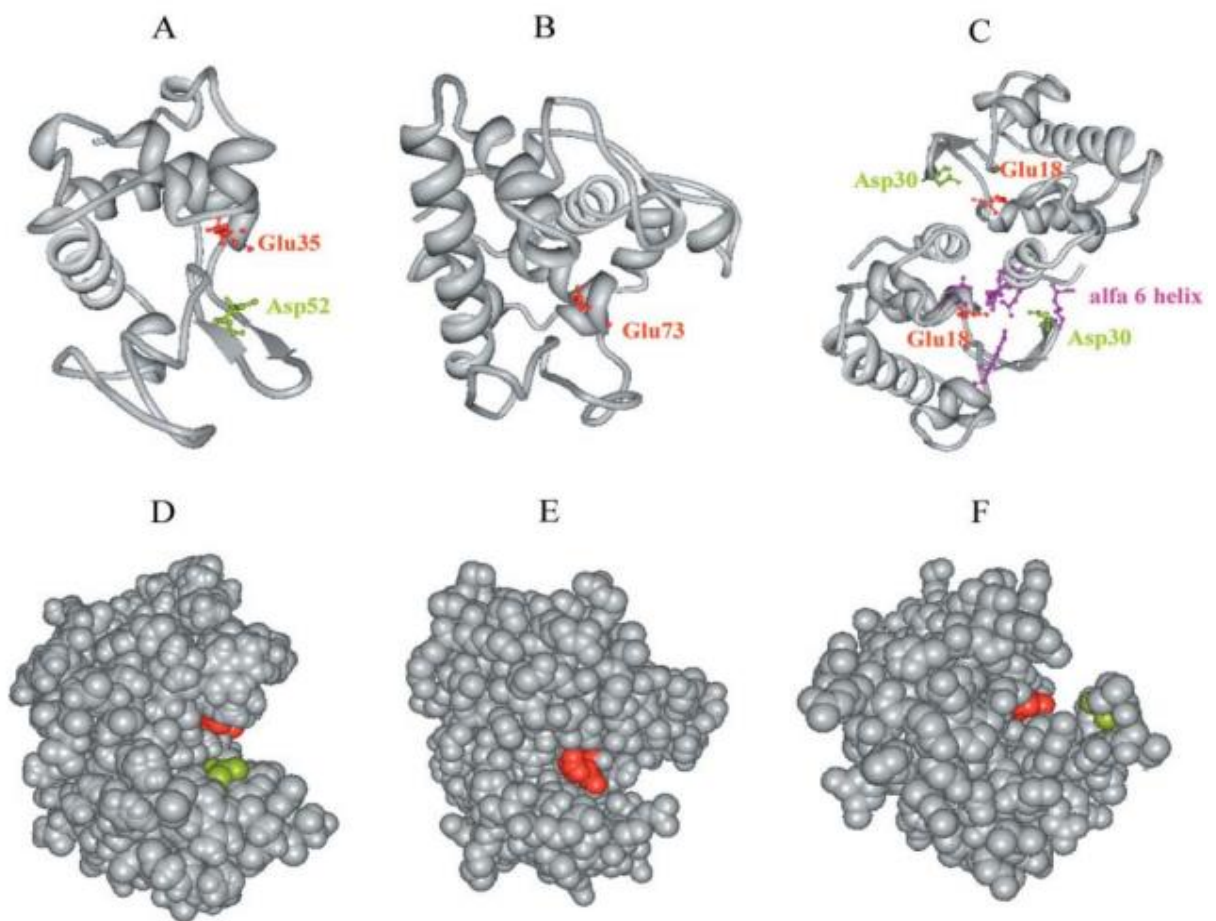


Рис.1.2. Стрічкові схеми тривимірної структури (А) HEWL, (В) GEWL і (С) димер TJL, з відповідними моделями, що заповнюють простір (D), (E) і (F) [17].

Орієнтації відповідних стрічкових моделей, і таких, які заповнюють простір кожного з лізоцимів, ідентичні. Спіралі і стрілки на схемах відображають α -спіралі і β -складчасті структури, відповідно. Залишки, які беруть участь в утворенні димеру TJL, показані червоним кольором в (С).

Лізоцим *c*-типу - основний ензим, який виробляється у більшості хребетних, в тому числі ссавців. Лізоцим людини був першим секвенованим лізоцимом ссавців. Інші хребетні, такі як птахи, риби, рептилії і амфібії також продукують або несуть гени лізоциму *c*-типу.

Лізоцим *g*-типу (гусячий тип) (GEWL) був вперше ідентифікований в яєчному білку гусей породи Ембден. З тих пір він був охарактеризований у ряду видів птахів, чорних лебедів, страусів.

Третій тип лізоциму царства тварин отримав назву лізоциму безхребетних (*i*-тип) (TJL). Лізоцим *i*-типу відсутній у всіх доступних геномах хребетних (ссавців) і знайдений у молюсків, кільчастих хробаків, голкошкірих, круглих черв'яків і членистоногих. Існування цього типу лізоциму було припущено ще в 1975 році на основі порівняння N-кінцевої послідовності амінокислот лізоциму, виділеного з морської зірки *Asterias rubens* з іншими типами лізоциму [21, 22]. Перша амінокислотна послідовність лізоциму *i*-типу була виявлена в 1999 році у морського двостулкового молюска (*Tapes japonica*).

Ідентичність амінокислотної послідовності в *c*-, *g*- і *i*-типах лізоциму низька: до 24% (по 111 залишків амінокислот) для HEWL і TJL, 19% (по 129 залишків) для HEWL і GEWL, і 16% (по 121 залишків) для GEWL і TJL. Молекулярна маса лізоциму *g*-типу істотно більше (~ 20 - 22 кДа), ніж лізоциму *c*- і *i*- типів (~ 11-15 кДа) [23].

Білок курячого яйця залишається найбагатшим джерелом лізоциму з концентрацією в діапазоні від 3400 до 5840 мг/дм³ [24, 25].

Фізичні та хімічні властивості лізоциму HEWL

Чисті препарати мурамідази яєчного білка розчиняються в підкислених розчинах, але не в органічних розчинниках. Ізоелектрична точка дорівнює 10,5 - 11,0; фермент містить 48,65% С, 6,44% Н, 15,38% N, 0,25% Р, 0,64% S (у вигляді S-S) і 3,31% золи. Частково осаджується трихлороцтовою, сульфосаліциловою і іншими кислотами (рис. 1.3), солі важких металів

лізоцим інактивують. Аналогічно діють хлороформ, пероксиди і поверхнево-активні речовини. Неденатурований лізоцим стійкий до дії трипсину, однак пепсин гідролізує його з помітною втратою активності.

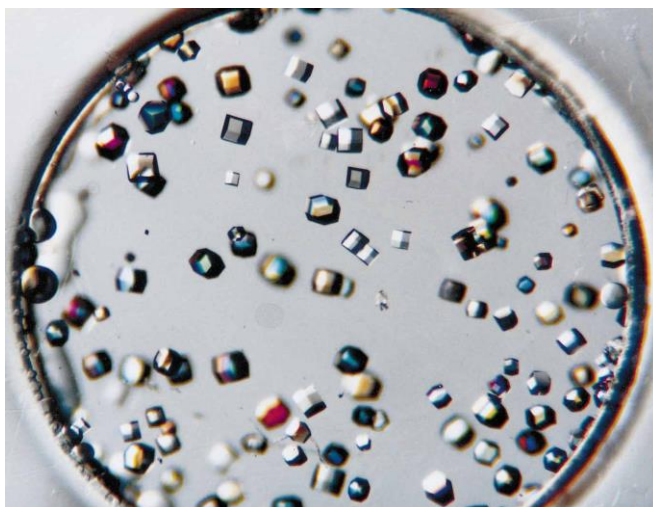


Рис.1.3. Кристали лізоциму (40 мг/см^3 , $0,5 \text{ M NaCl}$, 50 см^3 оцтової кислоти, $\text{pH } 4,5$, $0,1 \%$ агарозний гель) [26].

Лізоцим HEWL має форму, схожу з еліпсоїдом, з глибокою щілиною на одній стороні, розміром - $30 \times 30 \times 45 \text{ Å}$, в розчині вона гідродинамічно еквівалентна еліпсоїду обертання з великою і малою осями 55 ± 1 і $33 \pm 1 \text{ Å}$, відповідно (рис. 1.2 А).

Внутрішня частина еліпсоїда містить неполярні гідрофобні залишки: всі карбоксильні групи молекули розташовані на поверхні, однак реакційна здатність їх різна. Щілина також частково вистелена гідрофобними групами. Гідрофобне ядро еліпсоїда забезпечує стабільність молекули ферменту.

Механізм гідролітичної дії лізоциму представлений на рис. 1.4. Неіонізована карбоксильна група Glu-35 виступає як донор протона, поставляючи його глікозидному атому кисню між атомом С (1) цукру D і С(4) цукру E (стадія загального кислотного каталізу); це призводить до розриву глікозидного зв'язку. В результаті залишок цукру D переходить в стан карбкатиона з позитивно зарядженим атомом вуглецю і приймає конформацію напівкрісла. Негативний заряд карбоксилатної групи Asp-52

стабілізує карбкатіон. Залишок NAG2 (цукру E + F) дифундує з області активного центру. Потім в реакцію вступає молекула води; її протон переходить до Glu-35, а OH-група до атому C(1) залишку D (стадія загального основного каталізу). Залишок NAG4 (цукру D + C + B + A) йде з області активного центру, і фермент повертається у вихідний стан.

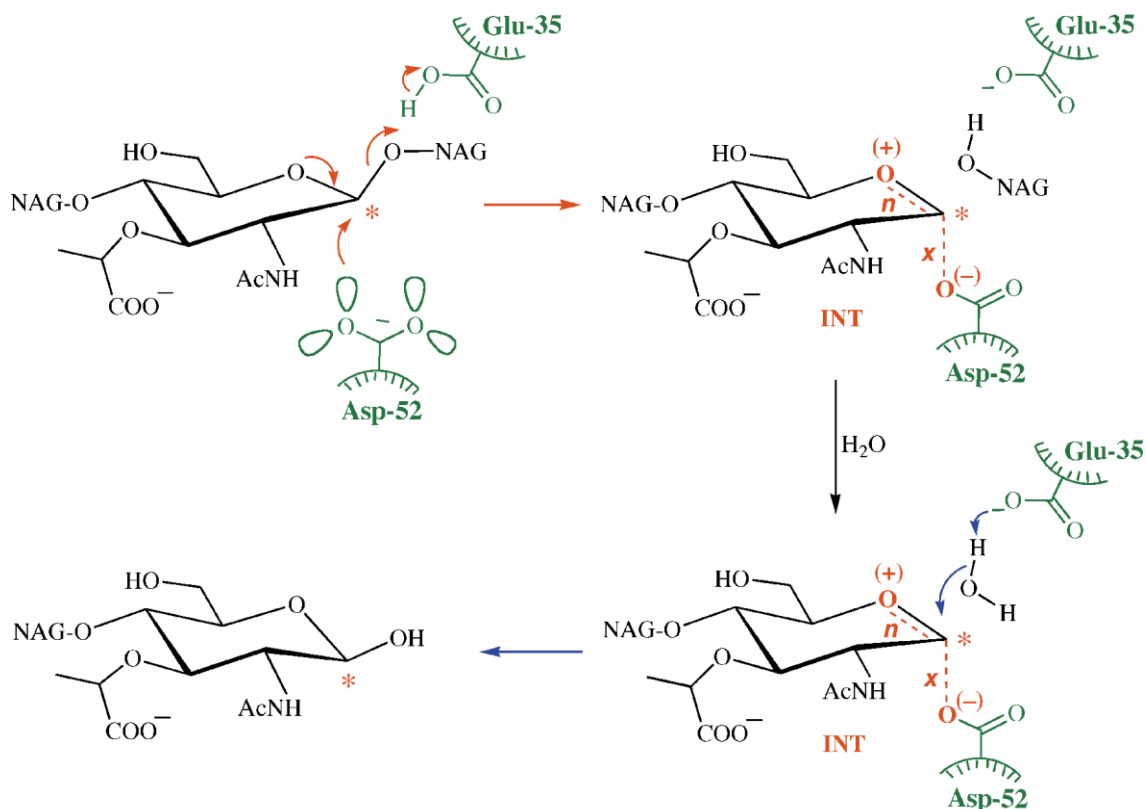


Рис.1.4. Розщеплення лізоцимом глікозидного зв'язку в молекулі субстрату [27]

Лізоцим - один з перших виділених протеїнів (початок 1900-х рр.). Спочатку виділення його здійснювали висолюванням сульфатом амонію, проте зміна рН і високі концентрації солі негативно впливали на активність ензиму. Виділений з використанням сульфату амонію лізоцим був стабільний в кислих, але тільки частково розчинний в лужних умовах через утворення кристалів [28].

У 1984 р. для виділення ензиму застосували іонообмінну хроматографію з використанням карбоксиметилцелюлози як носія, що виявилось неефективним в періодичних процесах внаслідок малого розміру часток і, відповідно, повільній швидкості потоку в колонці [29].

У 2007 р. групою чеських вчених було запропоновано використовувати в процесі виділення магнітну катіонообмінну великопористу целюлозу [30]. Перевагами цього процесу були одностадійність і чистота одержуваного ензиму (більше 96%), проте основний недолік - висока вартість смоли, що обмежує використання зазначеного методу.

З метою отримання лізоциму застосовували також і нехроматографічні методи. Chang зі співавторами для виділення лізоциму поряд з іншими інгредієнтами запропонували використовувати β -меркаптоетанол [31]. Однак цей метод не знайшов широкого розповсюдження через денатурацію протеїну і токсичність β -меркаптоетанолу, що обмежувало застосування лізоциму в харчовій промисловості і медицині.

У 2006 р. Wan і співавтори запропонували використовувати для виділення лізоциму ультрафільтрацію. Метод дозволяє отримувати ензим з чистотою і виходом 80%, однак його застосування для очищення лізоциму обмежено лише масштабами лабораторії [32].

Оскільки існуючі численні методи виділення лізоциму з білка курячих яєць (лізоцим *c*), зокрема хроматографічні, ультрафільтрація, розподіл за допомогою обернених міцел, в двофазних системах, магнітне розділення, металоафінне осадження, адсорбція на рослинних відходах і ін., мають ряд недоліків, пошук, вдосконалення існуючих або розробка нових методів отримання лізоциму є актуальним завданням біотехнології.

Лізоцим широко застосовується в медицині, оскільки є активним ензимом, що бере участь в неспецифічній імунній відповіді. Важливою біологічною властивістю лізоциму є здатність викликати порушення проникності мембран, метаболізму і процесів клітинного росту

грампозитивних бактерій. Разом з тим, лізоцим ефективний стосовно окремих штамів грамнегативних бактерій, а також грибів роду *Candida* [4].

Ензим успішно застосовується при лікуванні бронхіальної астми, самотійно або на тлі загальноприйнятого лікування, при ревматизмі. Сумісне використання лізоциму з антибіотиками ґрунтується на його синергізмі з рядом таких, в тому числі з ампіциліном. Лізоцим не тільки підвищує протиінфекційну і протитоксичну резистентність, але й безпосередньо впливає на Т-і В-лімфоцити [33]. Ензим має також високу антигістамінну активність, проте він втрачає її при зберіганні [34]. У літературі є небагаточисленні відомості про використання лізоциму в онкології [35].

В офтальмології ензим використовується в комбінації з тетрацикліном для лікування трахоми. Відомі роботи щодо застосування лізоциму при хронічних кон'юнктивітах, виразкових кератитах, опіках і травмах очей [33].

У стоматології застосування лізоциму позитивно впливає при лікуванні виразкового і катарального стоматитів, пародонтитів. Відомі роботи по впливу лізоциму на карієс зубів [36, 37]. Ензим виконує ключову роль в системі антимікробного захисту порожнини рота, в зв'язку з цим при стоматологічній патології вимірювання рівня лізоциму в слині або ясенній рідині є індикатором тяжкості процесу. Визначення лізоциму в ротовій рідині і вмісті зубо-ясенної кишені у хворих з запальними захворюваннями пародонту показало, що на початку захворювання спостерігається зростання активності ензиму в слині, а потім прогресуюче зниження його рівня, що досягає мінімальних значень при II-III ступенях генералізованого пародонтиту. Збільшення рівня лізоциму в ротовій рідині пов'язано з міграцією лейкоцитів в зубо-ясенній кишені при пародонтиті, а лейкоцити є одним з найбагатших джерел ензиму [38].

Є ряд робіт про ефективність застосування лізоциму для лікування хронічного періодонтиту. Автори обґрунтували застосування лізоцимвмісної

пасти для збереження життєздатності пульпи зубів при пульпіті. Спочатку порожнину зуба промивали 0,1% розчином лізоциму на 0,9% NaCl, а потім вводили пасту наступного складу: лізоцим - 0,01 г, масляний розчин вітаміну А - 0,1 см³, окис цинку - до консистенції пасти. Виявилося, що найбільш чутливі до лізоциму стрептококи і ентеропатогенні ешерихії.

В даний час в Україні зареєстровано кілька таблетованих лізоцимвмісних препаратів: «Лісобакт» боснійської фірми «Bosnalijek», «Гексаліз», виробництва «Laboratoires BOUCHARA-RECORDATI» (Франція) і «Лізак», що випускається АТ «Фармак» (Україна) [39].

Показаннями до застосування даних препаратів є місцеве антисептичне лікування запальних процесів ротової порожнини і горла, спричинених чутливими до препарату збудниками (катаральний, виразковий, фіброзний гінгівіт; афтозний стоматит; кандидоз порожнини рота і глотки; фарингіт; тонзиліт; ларингіт і глосит). Виробники вказують, що препарати не мають побічних ефектів і особливих протипоказань, алергічні реакції на будь-який з компонентів таблетки практично відсутні. Прийом їх можна поєднувати з антибактеріальними препаратами, включаючи антибіотики, з метою посилення їх дії і зменшення дозування. Лізоцим підвищує ефективність таких антибактеріальних препаратів, як пеніцилін, хлорамфенікол. Однак дозування лізоциму з огляду на його низьку біодоступність в перерахованих препаратах висока (10 - 20 мг в таблетці) або вимагає додаткового введення в таблетку фенолвмісних антимікробних сполук, а це в свою чергу значно збільшує протипоказання до застосування препарату і обмежує коло пацієнтів.

Таким чином, створення препаратів лізоциму для підвищення його біодоступності, збільшення локальної концентрації, тривалості дії ферменту, його сайт-специфічного введення при захворюваннях слизової оболонки порожнини рота є актуальним завданням, стимулює як фундаментальні, так і

прикладні дослідження. Перспективним вирішенням вищеописаних проблем є розробка іммобілізованих мукоадгезивних форм ферменту.

1.2. Біотехнологія іммобілізації лізоциму

Іммобілізація (лат. «*immobilis*» - «нерухомий») – це широко розповсюджена технологія закріплення ферменту на поверхні або всередині носія, що дозволяє поліпшити стабільність ензиму.

Іммобілізація ферментів - це не нова концепція, їй уже понад 100 років. Однак широке застосування іммобілізовані ферменти отримали за останні чотири десятиліття в наступних напрямках:

- біокатализатори синтезу різних складних інтермедіатів ліків,
- хімічний синтез в м'яких умовах, що виключає утворення токсичних побічних продуктів;
- очищення ефективним способом забрудненої води, повітря та ґрунту шляхом видалення полютантів;
- діагностика захворювань;
- корекція різних захворювань, що виникають через відсутність метаболічних ензимів та ін. [40, 41]

Дискусія про іммобілізацію ферментів також підняла різні проблеми, такі як зниження активності ензиму через конформаційні зміни, можливості денатурації ферменту і зміна кінетичних властивостей, обмеження масопереносу і більш низька ефективність у присутності нерозчинних субстратів.

Проте згадані проблеми не відносяться до всіх типів іммобілізаційних систем. Отже, вибір методу, як і раніше, залежить від конкретного випадку, наявних структурних та механічних знань, інтересу і практичних міркувань [42, 43].

Іммобілізація - це «фундамент» для збільшення доступності ферменту для субстрату протягом значного періоду часу. В даний час іммобілізовані

ферменти кращі, ніж їх вільні аналоги, завдяки підвищеній стабільності. Імобілізація є найпростішою технікою і робить зручним застосування ферментних препаратів [44].

Майбутні дослідження в області ензимології повинні бути спрямовані на розробку методів імобілізації із застосуванням інноваційно модифікованих носіїв для поліпшення якості імобілізації і забезпечення нових властивостей ферментів [45].

Властивості імобілізованих ферментів визначаються типом ферменту і матрицею, що використовується для імобілізації. При проведенні будь-яких нових досліджень в цій області зосереджуються, переважно, на відсотковому збереженні активності ензимів, стабільності їх роботи, селективності і зниженні інгібування продуктами або будь-яким іншим компонентом, присутнім в носії. Все це включає в себе інтенсивну оптимізацію імобілізаційних розчинів з метою контролю взаємодії між матрицею і ферментом, а також правильної орієнтації ензиму для збереження його каталітичних властивостей [46, 47].

За останні 100 років в біотехнології було розроблено безліч методів імобілізації ферментів, які, так чи інакше, включають в себе закріплення ензимів в різних матрицях або зв'язування їх на поверхні [48-51].

Для отримання імобілізованих препаратів лізоциму використовують два основні методи: хімічний або фізичний (рис. 1.6)

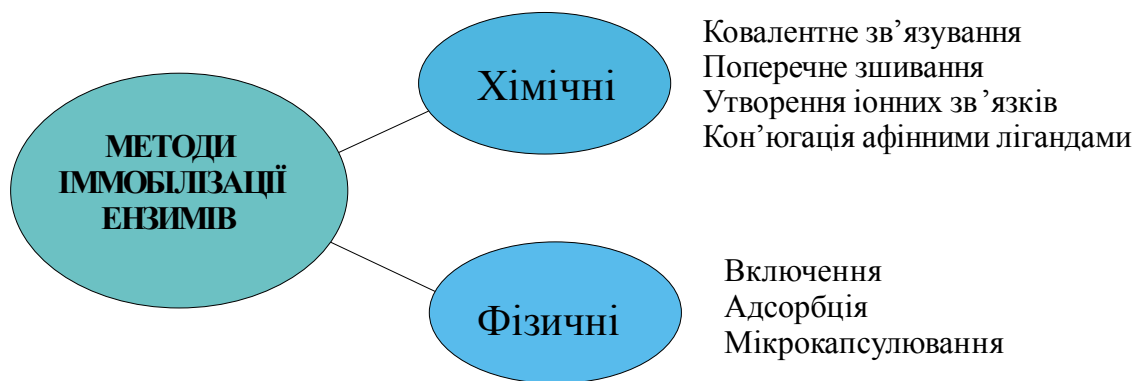


Рис.1.5. Огляд методів імобілізації ензимів [43]

Вибір відповідного методу є визначальним в процесі створення іммобілізованого ензиму, оскільки він буде позначатися в першу чергу на доступності активного центру і здатності ферменту проявляти активність. Також враховуються вартість іммобілізації, токсичність використовуваних реагентів, складність методу, бажані кінцеві властивості іммобілізованого продукту.

На рис. 1.6 схематично представлені методи адсорбції, включення в гель і ковалентної іммобілізації, які широко застосовуються в біотехнології ензимів.

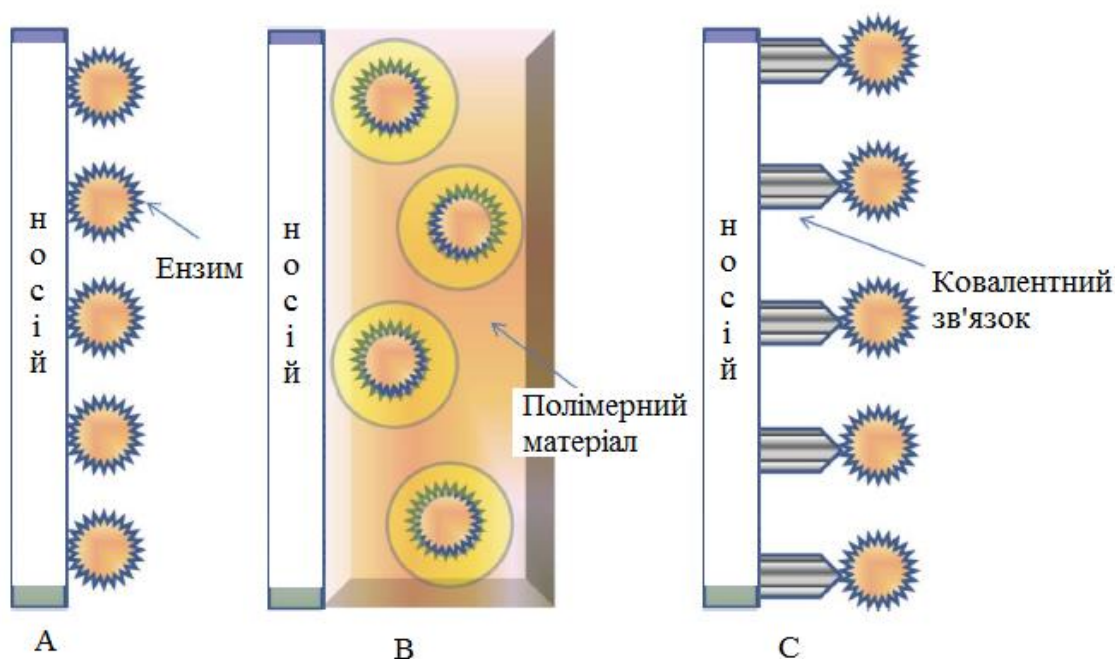


Рис.1.6. Схематичне зображення трьох найбільш широко використовуваних методів іммобілізації ензимів: (А) - адсорбція; (В) - включення в гель; (С) - ковалентна іммобілізація [52].

Фізичні методи характеризуються моновалентними взаємодіями, такими як водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії, ван-дер-Ваальсові сили, афінне зв'язування ферменту з матеріалом носія або механічне утримування ензиму в полімері. При хімічній іммобілізації найчастіше утворюються

прості ефірні, тіоефірні, амідні або інші ковалентні зв'язки між ферментом і носієм [53].

У загальному випадку методи ковалентної іммобілізації знижують активність ферментів через порушення їх третинної структури, забезпечуючи при цьому надійне, міцне зв'язування ензиму, можуть знижувати швидкість його інактивації і змінювати специфічність дії. Іммобілізація ферментів за рахунок нековалентних взаємодій, фізичними методами, шляхом їх включення або адсорбцією меншою мірою супроводжується порушенням структури і активності й успішно застосовується в медичній біотехнології [54, 55].

Широкому використанню полімерних матриць синтетичного і природного походження для створення нових перспективних лікарських форм сприяє відсутність токсичності, реакційна здатність, можливість модифікації для іммобілізації білків, ферментів, БАР і отримання препаратів з регульованою швидкістю вивільнення, місцем всмоктування.

Новим підходом у медичній біотехнології стало використання як носіїв для іммобілізації БАР полімерів, що мають мукоадгезивні властивості. Їх перевагою є здатність до збільшеного часу контакту зі слизовими оболонками, що особливо цінне в стоматології та офтальмології.

Біоадгезія - це механізм, за допомогою якого два біологічних матеріали зчеплюються міжфазними силами. Мукоадгезія описує сили сполучення між біологічним матеріалом і слизом або слизовою оболонкою [56]. Слизові оболонки прилипають до епітеліальних поверхонь, таких як шлунково-кишковий тракт, піхва, легені, око та інші. Вони, як правило, гідрофільні через велику кількість води (приблизно 95%) у своєму складі. Проте, муцин також містить глікопротеїни, що роблять можливим утворення гелеподібної речовини.

Розуміння механізмів гідрофільного зв'язування і адгезії слизу до біологічного матеріалу має першорядне значення для забезпечення найбільш

ефективного застосування. Наприклад, в системах доставки ліків необхідно проникнути через шар слизової, щоб ефективно транспортувати мікро- або нанорозмірні частинки лікарського засобу в організм (рис. 1.7) [57, 58].

Мукоадгезивний полімер повинен характеризуватися певними фізико-хімічними властивостями, включаючи гідрофільність, велику кількість груп, здатних взаємодіяти з БАР, рухливість ланцюгів, достатню для дифузії, як через слизову оболонку, так і епітеліальну тканину [59-61]. Так, здатність відтягувати воду з поверхні слизової оболонки в сухому вигляді веде до міцної взаємодії.

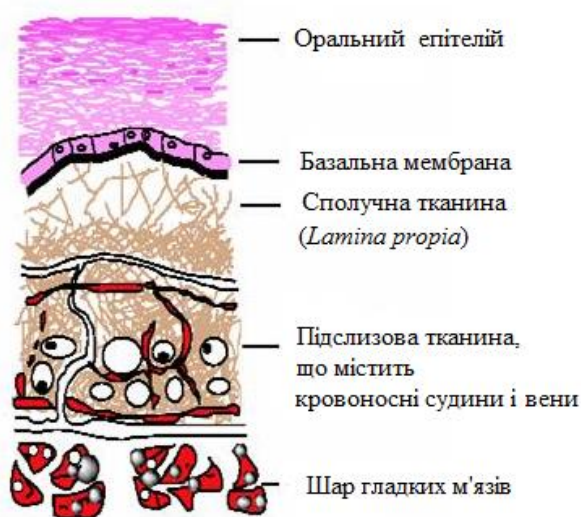


Рис.1.7. Будова слизової оболонки порожнини рота [62].

При зволоженні мукоадгезивний полімер утворює в'язкі рідини, що збільшує час перебування їх на поверхні слизової оболонки і сприяє в подальшому виникненню адгезивних взаємодій, до яких відносяться:

- механічні і фізичні взаємодії, наприклад, переплетення гнучких ланцюгів полімеру і муцину;
- гідрофобні взаємодії;
- Ван-дер-Ваальсові взаємодії;
- електростатичні взаємодії;
- ковалентні зв'язки [21, 63].

Існує шість загальних теорій адгезії, які були адаптовані для дослідження мукоадгезії (рис. 1.8):

- 1) *електронна теорія* припускає, що передача електронів відбувається при контакті прилягаючих поверхонь через відмінності в їх електронній структурі;
- 2) *теорія зволоження*, в першу чергу, застосовується до зв'язування рідини з муцином і розглядає поверхневі та міжфазні енергії, передбачаючи здатність рідини поширюватися на поверхні як необхідної умови для розвитку адгезії;
- 3) *теорія адсорбції* описує прикріплення поверхонь за рахунок утворення водневих зв'язків або Ван-дер-Ваальсових взаємодій. При цьому теорія хемосорбції, передбачає взаємодію внаслідок ковалентного зв'язування;
- 4) *теорія дифузії* керується градієнтами концентрації і залежить від довжини молекулярних ланцюгів полімерів та їх гнучкості. Глибина взаємопроникнення залежить від коефіцієнту дифузії та часу контакту поверхонь;
- 5) *механічна теорія* передбачає таку адгезію, що виникає від зчеплення рідкого адгезиву з нерівною шорсткою поверхнею. В даному випадку шорсткість матеріалу також забезпечує збільшену площу поверхні, доступну для взаємодії;
- 6) *механізм дегідратації* виникає, коли мукоадгезивний матеріал поглинає воду з поверхні слизової оболонки, набрякає, утворює гель і міцний мукоадгезивний зв'язок.

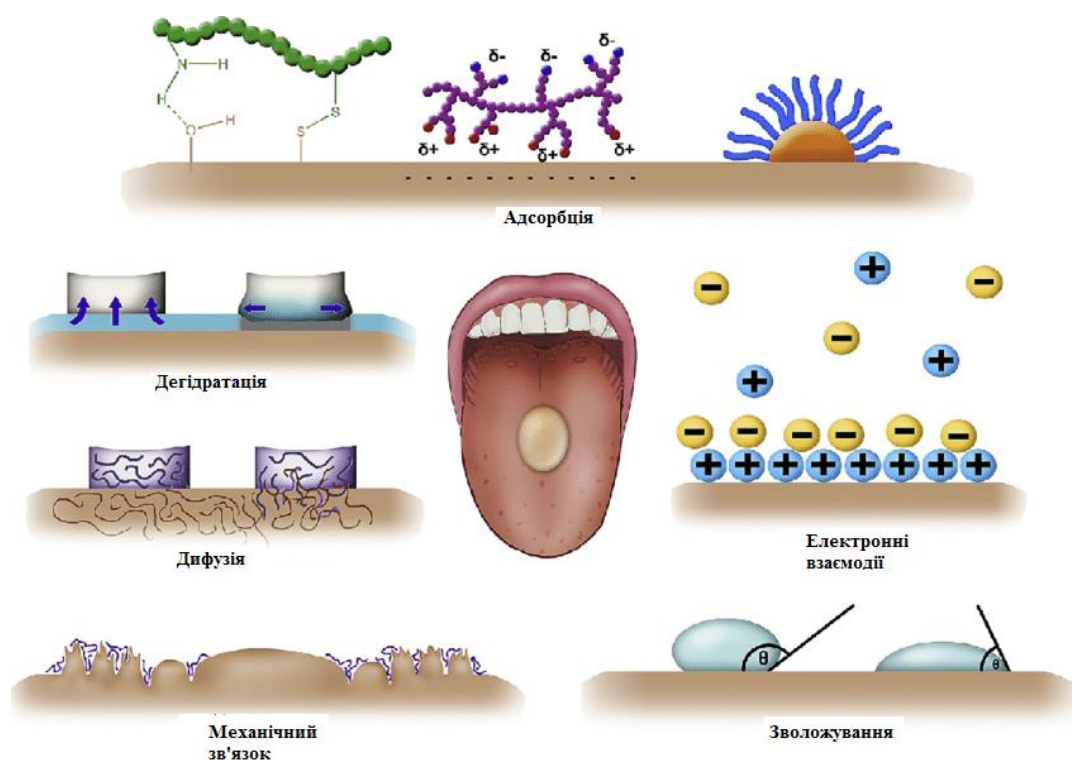


Рис. 1.8 Шість основних механізмів мукоадгезії: адсорбція, дегідратація, дифузія, зволоження, електронна і механічна теорії.

Фактори, здатні впливати на величину сили мукоадгезії полімерів до муцинового шару слизової оболонки, наведені нижче в табл. 1.1

Таблиця 1.1

Фактори, що впливають на на мукоадгезію [64]

Фактор	Характеристика, приклади
Молекулярна маса	Властивості мукоадгезивного полімеру Низькомолекулярні полімери краще проникають в шар слизової оболонки. Висока молекулярна маса (М.м.) сприяє фізичному переплетенню. Оптимальна М.м. знаходиться в межах від 10^4 до 10^6 . Полімери з великою М.м. не будуть швидко змочуватися і розкривати вільні групи для взаємодії з муцином, тоді як полімери з невеликою М.м. формуватимуть неміцні гелі або швидко розчинятимуться.

Гнучкість полімерних ланцюгів	Одна з умов для дифузії ланцюгів і їх переплетення з муцином. Для полімерів з високим ступенем зшивання рухливість окремих полімерних ланцюгів зменшується, це веде до зменшення сили мукоадгезії.
Здатність до утворення водневих зв'язків	Наявність функціональних груп, здатних до утворення водневих зв'язків.
Ступінь набухання полімеру	Набрякання полімеру робить можливим механічне переплетення, завдяки розкриттю полімерних ланцюгів, і подальшому утворенню водневих зв'язків і/або електростатичним взаємодіям між полімером і компонентами слизової.
pH	Фактори, що залежать від навколишнього середовища Зміна pH приводить до відмінностей в ступені дисоціації функціональних груп вуглеводних послідовностей або амінокислот поліпептидного ланцюга, а також полімеру.
Тиск, що прикладається до системи для закріплення	Впливає на глибину дифузії ланцюгів. Не може контролюватися для систем, що застосовуються в шлунково-кишковому тракті.
Час першого контакту	Визначає ступінь набрякання і дифузії полімерних ланцюгів. Не може контролюватися для систем, що застосовуються в шлунково-кишковому тракті.
Зволоження	Необхідно, щоб мукоадгезивний полімер поширювався по поверхні і створював «макромолекулярну сітку» достатнього розміру для взаємопроникнення молекул полімеру і муцину, а також для посилення рухливості полімерних ланцюгів.
Присутність іонів металів	Взаємодія з зарядженими групами і/або слизової оболонки може зменшити кількість ділянок взаємодії й міцність мукоадгезивного зв'язку.
Швидкість відновлення клітин слизової оболонки	Фізіологічні фактори. Сильно варіюють для різних типів слизових оболонок. Обмежують час перебування біоадгезивних систем доставки на поверхні слизових оболонок.

Хвороби, що супроводжують	Можуть змінювати фізико-хімічні властивості слизу або її кількість. Підвищення температури тіла, виразкова хвороба шлунка, коліти, фіброз тканин, алергічний риніт, бактеріальна або грибкова інфекція і запалення.
Рухливість тканин	При споживанні рідини і їжі, розмові, перистальтиці шлунково-кишкового тракту.

Таким чином, вибір носія і методу іммобілізації залежить від області застосування препарату, що розробляється.

Для створення препаратів лізоциму медичного застосування перспективно використання мукоадгезивних полімерів, що забезпечать збільшення концентрації ензиму / БАР в місці аплікації, певний вектор всмоктування і точність дозування.

Розглянемо перспективні, з нашої точки зору, мукоадгезивні полімери для іммобілізації лізоциму.

Желатин - продукт деструкції колагену, являє собою полікомпонентну систему, завдяки якій полімеру властивий широкий молекулярно - масовий розподіл, тобто желатин є полідисперсним об'єктом з пептидними ланцюгами різної довжини.

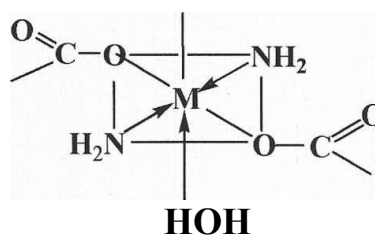
В даний час для желатину найбільш імовірна прийнята структура поліпроліну II [21]. Така структура в основному складається з чотирьох амінокислотних залишків: гліцин - пролін - оксипролін - гліцин. При деструкції поліпептидні ланцюги розщеплюються по пептидним зв'язкам, утворюючи фрагменти молекул різної довжини. Застосування сучасних досконалих методів фракціонування дозволяє виділяти з розчинів промислових препаратів желатину і ряд гомогенних фракцій, значення їх молекулярних мас лежать в межах від 15000 до 250000. У водних розчинах при досить високій температурі (60 - 70 °C) пептидні ланцюги желатину приймають конформацію статистично згорнутого клубка. Це явище, характерне для поведінки синтетичних лінійних високомолекулярних

речовин, дозволяє розглядати желатин з точки зору теорій, що застосовуються для подібних полімерних систем.

Желатин широко використовується у фармацевтичній промисловості для капсулювання ЛЗ, виготовлення лікувальних сироваток, штучних судин, препаратів для консервування кісткового мозку і виділення лейкоцитів з донорської крові, біологічних рідин для внутрішньовенного введення, в біотехнології як носія БАР. Желатин характеризується високими желуючими властивостями, водні розчини полімеру при охолодженні до 10-15 °С утворюють гелі, поглинаючи до 10 - 12 об'ємів води.

Гелі желатину є двофазними ліофільними дисперсними системами. Термозворотній процес структуроутворення в них зв'язаний з ренатурацією колагеноподібних спіралей при охолодженні нижче 35 °С, виділенням нової фази - агрегатів макромолекул полімеру і встановленням контактів між ними з розвитком тривимірної просторової структури гелю. Контакти між виділеними частинами нової фази можуть здійснюватися в результаті утворення водневих зв'язків, а також гідрофобних і електростатичних взаємодій. Модель сітки закріплення в гелі желатину являє собою комбінацію структурних елементів ланцюга: пружних (потрійні колагенові спіралі - вузли сітки) і в'язучих (невпорядковані поліпептидні ділянки ланцюга), що утворюють нескінченний кластер, характеризується набором реологічних параметрів, властивих твердому тілу. Шляхами регулювання властивостей желатину можуть бути ковалентне приєднання гідрофобних радикалів (залишків жирних кислот), формальдегіду. При цьому формальдегід утворює хімічні зв'язки з функціональними групами молекул білка (NH_2 - і NH -), а також з поперечними метиленовими містками лізин-лізинових або лізин-пептидного типів. Показано, що іони тривалентного заліза при низькій концентрації утворюють координаційні зв'язки з двома або кількома карбоксильними групами, формуючи сітчасту структуру гелю.

Отримано комплекси желатину з іонами Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , причому не виключається утворення координаційних центрів в ланцюзі:



Встановлено, що іони Cu^{2+} утворюють з желатином комплексні сполуки складу 2: 1, причому ступінь комплексоутворення зменшується при зростанні ступеня зшивання і зростає при збільшенні рН.

Показано, що нейтральні солі уповільнюють включення води в полімер, запобігаючи утворенню колагенової складчастості.

Желатин має такі властивості мукоадгезивного полімеру, що робить його перспективним носієм для іммобілізації і отримання мукоадгезивних лікарських форм [65]:

1. висока М.м. (молекулярно-масовий розподіл 80-120 кДа);
2. гнучкість полімерних ланцюгів;
3. здатність до утворення водневих зв'язків;
4. висока ступінь набрякання.

Крім того, використовують модифіковані форми желатину або в комплексі з іншими полімерами для розробки букального, вагінального, перорального шляху введення лікарських речовин [66].

Італійськими дослідниками [67] отримані плівки і мікрогранули на основі желатину і λ -карагінану шляхом комплексоутворення полімерної матриці з тимололу малеатом. Показано, що зміною відношення карагінан: желатин можна моделювати профіль вивільнення лікарської речовини, а також мукоадгезивні властивості препарату.

В роботах японських авторів [68] розроблені біорозкладаємі мукоадгезивні мікрогранули з використанням амінованого желатину для пролонгованого вивільнення амоксициліну, ковалентно зв'язаного з полімером глутаровим альдегідом. Відзначено, що аміновані желатинові мікрогранули мають більш високу адгезію по відношенню до слизової шлунка, ніж немодифіковані желатинові мікрогранули, внаслідок поліпшення гнучкості ланцюгів і більш сприятливій конформації полімеру. Показано ефективну антимікробну дію розробленого препарату щодо *Helicobacter pylori*, спіральної бактерії, яка знаходиться в шлунковому шарі слизу і колонізує слизову оболонку шлунка.

На основі гібридного полімеру, отриманого етерифікацією желатину з полівініловим спиртом, розроблені мукоадгезивні очні плівки з гідрохлоридом ципрофлоксацину, що забезпечують більш високу біодоступність, пролонгване вивільнення протягом 24 год і ефективність терапевтичної дії препарату на моделях виразки рогівки і зовнішніх очних інфекцій кролів-альбіносів, в порівнянні з очними краплями [69].

У літературі зустрічаються роботи, де желатин виступає як мононосій [70-75], так і роботи з желатином як одним з компонентів матриці: трикомпонентні мукоадгезивні системи карбопол / альгінат натрію / желатин [76], мембрани складу полівініловий спирт/желатин для офтальмології [77], хітозан/желатин [78], желатин/натрієва сіль карбоксиметилцелюлози [79] та ін.

Ще один мукоадгезивний полімер, що представляє інтерес - натрієва сіль карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) [80]. Її отримують шляхом обробки целюлози лугом, карбоксиметилуванням, сушінням і подрібненням готового продукту. Молекулярна маса Na-КМЦ знаходиться в широкому діапазоні, від 90000 до 700000 Да.

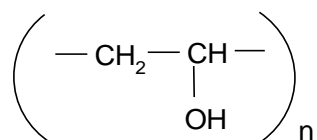
Na-КМЦ широко використовується у виробництві пероральних лікарських препаратів та препаратів для зовнішнього застосування, перш за

все, для підвищення їх в'язкості. У концентрації 4-6% входить до складу мазей, паст як гідрогелева основа, а також препаратів для парентерального застосування. Na-КМЦ використовується як сполучний матеріал, розпушувальна субстанція (покрщує розпадаємість за рахунок набрякання) у виробництві таблеток (2-3%), в рідких лікарських формах - як аніонно-активний емульгатор і стабілізатор емульсій - збільшує в'язкість водного середовища. Водний розчин полімеру є слабколужним, що може викликати гідроліз діючих речовин [23].

Na-КМЦ - один з головних компонентів адгезійно-поглинаючих систем при лікуванні проблемних ран, використовується для видалення ранового вмісту, ексудатів і потовиділення [81]. Ця слизово-зв'язувальна властивість Na-КМЦ використовується у виробництві продукції для модифікації кінетики вивільнення діючих речовин. Інкапсулювання з використанням Na-КМЦ підвищує стабільність і впливає на швидкість вивільнення лікарських речовин з систем.

Крім того, Na -КМЦ широко використовується в косметиці, хірургічному протезуванні, в складі предметів особистої гігієни, харчових продуктів, клеїв та ін. Застосування Na -КМЦ як мукоадгезивного полімеру розглянуто в роботах [82-87] і багатьох інших.

Полівініловий спирт - синтетичний, водорозчинний, термопластичний полімер, який теж характеризується мукоадгезивними властивостями [88-91].



Синтез ПВС здійснюється реакцією лужного / кислотного гідролізу або алкоголізом складних полівінілових ефірів. Основною сировиною для отримання ПВС служить полівінілацетат.

За величиною М.м. ПВС поділяють на чотири групи:

- олігомерні (4000-10000);

- низькомолекулярні (10000-45000);
- середньомолекулярні (45000-150000);
- високомолекулярні (150000-500000).

Фізико-механічні характеристики і в'язкість водних розчинів залежать від молекулярної маси полімеру і вмісту в ньому вінілацетатних ланцюгів.

При нагріванні на повітрі ПВС жовтіє, не плавиться, потім темніє. Цей процес супроводжується термоокиснювальною деструкцією, що призводить до розриву макромолекул. Високомолекулярний полімер легше піддається деструкції, яка проходить через стадії утворення гідропероксидів, дегідратації і утворення хромофорних груп, появи ненасиченості і карбонільних груп.

В технології ліків ПВС застосовується як емульгатор, загусник і стабілізатор суспензій, пролонгатор дії ЛР, плівкоутворювач для капсул, таблеток, лікарських плівок, компонент мазевих основ [92]. Є відомості про пролонгацію дії 2,5 - 10% розчинами ПВС пілокарпіну, антибіотиків, гомотропіну, скополаміну, атропіну, сульфапіридазину натрію, етазолу, преднізолону, дексаметазону [93].

Перспективними носіями для іммобілізованих ферментів є кріогелі полівінілового спирту - макропористі в'язкопружні полімерні гелеві матеріали, отримані в результаті кріогенної обробки, тобто після заморожування - витримування в замороженому стані - розморожування водних розчинів даного полімеру. Полімерними кріогелями називаються гелеві матеріали, сформовані в неглибоко заморожених розчинах полімерних або мономерних попередників. Неглибоко замороженими вважаються системи при температурах не нижче, ніж кілька десятків градусів від точки замерзання чистого розчинника. Подібні системи, як правило, є двофазними, вони містять полікристали твердої фази, які виконують роль порогенів, і невеликий об'єм, що залишається у вигляді розчину - так звана незамерзаюча

рідка мікрофаза, де концентруються розчинені речовини і відбувається формування кріогелевої матриці. Утворені кріогелі зазвичай мають макропористі (від 0,1 до 10 мкм) або надмакропористі структури (від 10 до 1000 мкм) зі взаємопов'язаними (водними каналами, які мають менші розміри) порами. Гетерогенна пориста структура кріогелю стає більш досконалою в міру збільшення часу заморожування і підвищення концентрації ПВС.

Полівініловий спирт доступний, є продуктом великотонажного синтезу, кожна його марка стандартизована. Завдяки високій міцності, вираженій пористості, біосумісності і стабільності в біологічних середовищах КГПВС знайшли широке застосування в різних сферах біотехнології.

При розробці мукоадгезивних систем доставки лікарських засобів полівініловий спирт розглядається як носій в роботах [94-101] і багатьох інших.

Імобілізація лізоциму

Лізоцим як модельний фермент, був іммобілізований з використанням різних полімерних носіїв і вивчений досить добре. Однак сучасні завдання вимагають розвитку досліджень з іммобілізації ензиму, з використанням нових підходів, інноваційних методів аналізу отриманих іммобілізованих систем, відпрацювання методів для лізоциму, отриманого з різних джерел та ін.

Лізоцим був ковалентно іммобілізований на целюлозних і полікапроамідних волокнах, з отриманням тканинних матеріалів для лікування гнійних ран. Питома активність була вищою у лізоциму, іммобілізованому на полікапроамідному носії, ніж на діальдегідцелюлозі і становила 29% від активності вільного ферменту [102].

Комерційний препарат "Совіаль", що представляє собою сополімер вінілпіролідону і діетилацеталу акролеїну, з вмістом акролеїну 10 - 15%,

використовувався для іммобілізації лізоциму з метою створення пролонгованої лікарської форми для застосування в стоматологічній практиці. Однак при модифікації фермент інактивувався, оскільки всі аміногрупи лізоциму зв'язувалися з альдегідними групами сополімеру [103].

Лізоцим був іммобілізований в біогелі Р-60 (матриця на основі поліакриламідного гелю). Отриманий препарат не мав вираженої бактеріолітичної активності, хоча зв'язував мікробні клітини, утворюючи фермент-субстратний комплекс з полісахаридом клітинної стінки бактерій. У цій же роботі проведена ковалентна іммобілізація лізоциму на силохромі призвела до незадовільних результатів. Так, вміст ферменту в препараті становив 10%, питома активність - 30% від активності вільного лізоциму [104].

Японськими авторами [105] для іммобілізації лізоциму були використані пористі кератинові губки, причому препарати, отримані на їх основі, проявляли різні властивості, що залежать від природи зшиваючого агента. Лізоцим, іммобілізований за допомогою утворених дисульфідних зв'язків, поступово вивільнявся з губки, а ензим, зшитий тіоефірним зв'язком, не вивільнявся з носія.

Відомі роботи італійських дослідників [106, 107] з розробки полімерних плівок полівінілового спирту з лізоцимом, ковалентно іммобілізованим на поверхні методом напилення сумісно зі зшиваючими агентами. Отримані плівки характеризуються високою антимікробною активністю в порівнянні з препаратами, отриманими включенням ензиму в поперечно-зшити полімерну матрицю.

На тканинні матеріали на основі шовку була проведена іммобілізація лізоциму за допомогою глутарового альдегіду і ацилазиду, як зшиваючих агентів [108].

Ефективним виявився метод іммобілізації лізоциму осадженням на носії на основі скляних волокон. Тестуванням отриманого препарату в

колонці встановлено, що концентрація бактерій в рідині, що пропускається через колонку, знизилася на 75% [109].

Нанотрубки, синтезовані з діоксиду кремнію, були також використані як носій для іммобілізації лізоциму. Процес проводили адсорбцією ензиму з водного середовища на гідрофільну поверхню носія. Активність лізоциму спочатку росла, а потім зменшувалась по мірі заповнення пор носія ферментом. Це свідчить про те, що нашарування і агрегація молекул ензиму знижують його активність в носії з великою площею поверхні [110].

В роботі [111] описано ферментативний реактор для лізису мікробних клітин, в якому лізоцим іммобілізовано в порожнині волокон гемодіалізатору з використанням епіхлоргідрину як зшиваючого агента. Суспензія клітин протікає через апарат без будь-яких перешкод, де клітини ефективно лізуються іммобілізованим лізоцимом.

Для адсорбції лізоциму використовувався термостійкий мезопористий матеріал AISBA-15. Стабільність носія та іммобілізованого ферменту після витримки декілька днів у водному середовищі була підтверджена рентгеноструктурним аналізом і методом ІЧ-спектроскопії. Виявлено, що адсорбуючу здатність носія можна контролювати зміною діаметра пор і їх об'єму [112].

В роботі [113] показано можливість іммобілізації лізоциму на бімодальному пористому матеріалі на основі діоксиду кремнію UVM-7, а також на ксерогелі, який представляє собою органо-кремнієвий сополімер. Вміст ферменту в препараті може бути змінено за допомогою зміни площі внутрішньої поверхні носія.

Для застосування в протиопіковій терапії отримані мазеві пов'язки з лізоцимом. Ензим додавали до мазевої основи, що представляє собою суміш ланоліну і вазеліну. Отриману суміш наносили на марлю. При використанні пов'язок спостерігався виражений терапевтичний ефект (зменшення гнійних виділень і прискорення відторгнення опікового струпа) [114].

Методом іммобілізації лізоциму на хітозанкремнеземних сорбентах отримані лікарські форми у вигляді аплікаційних суспензій. Активність іммобілізованого лізоциму зберігається на високому рівні, 86-97 % від активності вільного ферменту і становить 1270 - 2100 од/г [114].

Останні роки спостерігається поглиблення інтересу дослідників щодо іммобілізації лізоциму, що пояснюється більш високим рівнем досліджень в біотехнології і медицині.

Так, в роботі іранських вчених [115] вивчається іммобілізація лізоциму на нановолокнах бактеріальної целюлози (BCNF) з використанням методу фізичної адсорбції. Активність лізоциму знижувалася приблизно на 12 % після іммобілізації зі збереженням основних біохімічних характеристик ензиму. Лізоцим проявляє підвищену стабільність при зберіганні і показує більше 70 % вихідної активності після 9 циклів використання. Антимікробна активність ензиму щодо *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aspergillus niger* і *Saccharomyces serviseae* вища після іммобілізації. Зв'язування ензиму з носієм доведено методом рентгеноструктурного аналізу (зниження інтенсивності дифракції та індексу кристалічності нановолокон целюлози після іммобілізації лізоциму). Результати скануючої електронної мікроскопії свідчать про збільшений діаметр нановолокон за рахунок включення лізоциму. Ці дослідження демонструють перспективність використання BCNF як носія для іммобілізації ензимів.

Ковалентну іммобілізацію лізоциму на поверхні наноалмазів детонаційного синтезу, активованих бензохіноном, проводили з метою вивчення та розробки нових систем доставки лікарських засобів. Додавання ЕДТА до комплексу збільшувало лізуючий ефект більш, ніж в 2 рази. Однак активність іммобілізованого лізоциму була нижче активності вільного в 3 рази [116].

Поєднанням лізоциму, іммобілізованому на золотих пористих нанодротах, під дією ультразвуку вдалося протягом 1-5 хв досягти 69-84% знищення грам позитивних бактерій *Micrococcus lysodeikticus*. Ефективність дії біосумісних динамічних бактеріальних нанофайтерів забезпечується антибактеріальною активністю лізоциму і швидким рухом біокатализатора р-AuNW, що разом з відповідною динамікою рідини сприяє взаємодії ферменту з бактеріями і запобігає агрегації мертвих клітин на поверхні дроту, приводячи до значного збільшення здатності знищувати бактерії [117].

Ще одна робота, в якій іммобілізацію лізоциму в альгінат кальцію поєднували з ультразвуком, належить китайським вченим [118]. Схематично процес представлений на рис. 1.8

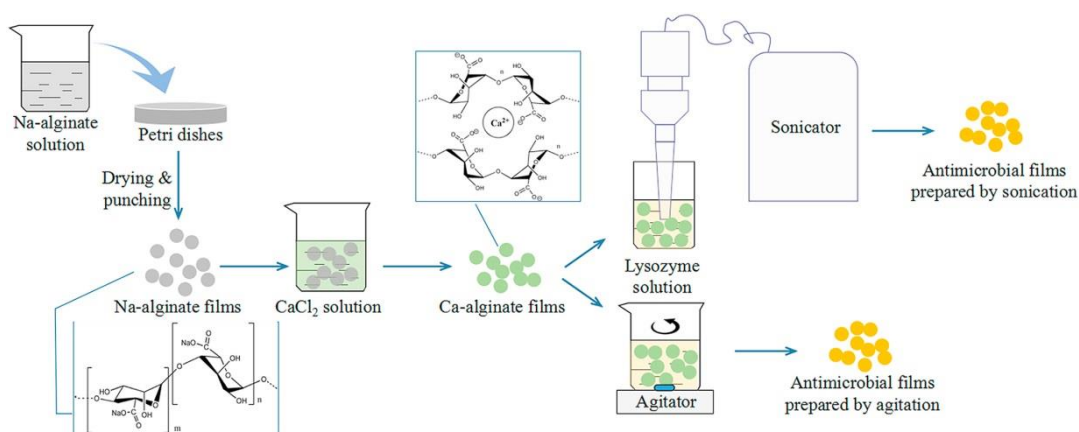


Рис.1.8. Схема приготування антимікробних плівок.

У дослідженні виявили, що ультразвукова обробка сприяє іммобілізації лізоциму на Ca-альгінатній плівці, і отримані таким чином матеріали чинять кращу бактеріостатичну дію. Спектри кругового дихроїзму та флуоресценції свідчать про вплив ультразвуку на вторинну і третинну структури лізоциму, а скануюча електронна мікроскопія виявила тріщини на поверхні плівок, що збільшили площу поверхні.

В роботі китайських вчених показано посилення і розширення антимікробної дії лізоциму, іммобілізованого на нановолокнах хітину [119]. Аналіз активності показав, що система лізоцим-нановолокна хітину проявляла активність в 1,5 рази вищу, ніж вільний лізоцим. Механізм взаємодії лізоциму, іммобілізованого адсорбцією, і матриці був досліджений

за допомогою UV-Vis спектрофотометрії, флуоресцентної спектроскопії і спектроскопії кругового дихроїзму. Результати показали, що зміни у вторинній структурі адсорбованого лізоциму приводили до збільшення ферментативної активності. Антимікробна активність системи лізоцим-нановолокна хітину також вища, ніж у вільного лізоциму, при цьому антимікробний ефект щодо грамнегативних бактерій більш виражений, ніж такий до грампозитивних бактерій.

Цікавим є аналіз іспанських і мексиканських вчених з розробки сечових катетерів з іммобілізованим лізоцимом. Катетери з полівінілхлориду з прищепленими сополімерами суміші N-вінілкапролактаму і 2-гідроксіетилметакрилату, попередньо активували карбонілдіімідазолом, потім проводили ковалентну іммобілізацію ензиму. Антимікробну літичну активність модифікованих матеріалів з плином часу перевіряли на *Micrococcus lysodeikticus*. Крім того, лізоцим зменшував адгезію золотавого стафілокока, запобігаючи утворенню біоплівки на поверхні катетерів [120].

Ще одна робота [121] присвячена застосуванню методу іммобілізації лізоциму на титанових поверхнях з метою запобігання адгезії і проліферації мікроорганізмів а, отже, руйнування імплантата. Титанові медичні диски ($\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$), попередньо обробляли кисневою плазмою для очищення і в той же час для підвищення гідрофільності поверхні. Лізоцим наносили на поверхню, після чого шар обробляли лимонною кислотою для стадії іонного зв'язування молекул ензиму без зміни його ферментативної активності. Функціоналізація лізоциму запобігала адгезії *Staphylococcus aureus*, в той же час підтримувала високу цитосумісність дисків з відповідними клітинними лініями. Стабільність покриття була продемонстрована після тривалого зберігання, циклів сушки, сублімації і звичайних протоколів γ -стерилізації. Навіть після тертя об матеріал, що імітує кістку, диски зберігали понад 70% активності ферменту.

Методом ковалентної іммобілізації на поліакрилнітрильній мембрані, за допомогою зшивання глутаровим альдегідом, отримані покриття з лізоцимом. Антибактеріальні тести підтвердили, що мембрана з іммобілізованим лізоцимом показала високу антибактеріальну активність щодо *Staphylococcus aureus* [122].

Метод ковалентної іммобілізації, запропонований Левашовим П.А. з співавторами [123] на агарозному носії, передбачає використання для зшивання бокових залишків лізину, які не беруть участі в каталізі. Для активації агарозної матриці застосовували бромистий ціан (BrCN), періодат натрію (NaIO_4) і глутаральдегід. Отриманий іммобілізований лізоцим розроблявся з метою розширення можливостей застосування ензиму в екстракорпоральній терапії при очищенні плазми крові.

Включенням в гель поліетиленгліколю метакрилату і поліетиленгліколю діакрілату отримано гідрогель з іммобілізованим лізоцимом, ефективною антибактеріальною дією щодо *E. coli* and *B. subtilis* (до 99,4%), багаторазового використання (до 11 циклів), з широким температурним вікном. Схематично процес отримання гелю і його антибактеріальна дія показана на рис. 1.9.

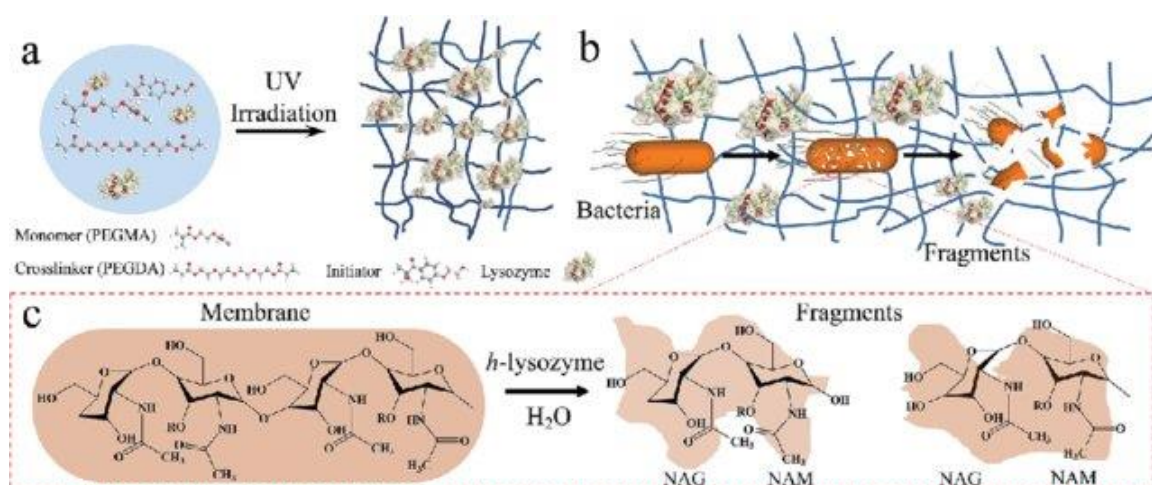


Рис.1.9. Схеми отримання гідрогелю з лізоцимом для модифікації бактеріальної мембрани. (А) іммобілізація, (В) антибактеріальний процес і (С) механізм знищення бактерій [124].

Синтез нанокompозитів з антимікробних біополімерів, таких як хітозан і лізоцим розглядається в роботі [125], і є значущою і перспективною галуззю в біонанотехнології. Наночастинки хітозан-лізоцим отримані методом нанопреципітації з використанням хітозану молекулярної маси 153 кДа. Розміри наночастинок знаходяться в діапазоні 13,4 і 11,8 нм для складів хітозан / лізоцим і хітозан, відповідно. У біологічних експериментах показано 100% інгібування проростання спор *Aspergillus parasiticus*.

При необхідності поступового вивільнення лізоциму з його іммобілізованої форми перспективно використання як носіїв для іммобілізації гідрогелів, що містять фосфатні групи, як зазначено в роботі [126, 127]. Іммобілізація відбувається за рахунок іонного зв'язування негативно заряджених фосфатних груп і позитивно зарядженого лізоциму. На вивільнення ензиму впливають іонна сила і рН.

Аналізуючи наявні в літературі відомості щодо іммобілізації лізоциму, можна стверджувати, що методи фізичної або хімічної іммобілізації досліджуються в рівній мірі і їх використання залежить від передбачуваної області застосування іммобілізованого лізоциму. Однак очевидно, що лізоцим при ковалентній іммобілізації втрачає гідролітичну активність повністю або зберігає її на рівні 10-30%. Тоді як застосування методів фізичної іммобілізації дозволяє зберегти її на 80-95% як після іммобілізації, так і протягом тривалого часу.

Цілі застосування іммобілізованого лізоциму обмежуються в основному трьома напрямками, в яких ензим виступає як модельний об'єкт для вивчення нової матриці; передбачається використання отриманого продукту в харчовій індустрії, та як і раніше актуальним залишається напрямок розробки препаратів медичного призначення.

Висновки до розділу 1.

Підсумовуючи результати огляду даних літератури, можна

стверджувати, що носії, які використовуються поряд з методами іммобілізації лізоциму, виявляють значущі резерви, як в збереженні активності, кількісного вмісту, збільшення пролонгування дії ензиму, так і в збільшенні ефективності його застосування.

Розробка нових біотехнологічних підходів для створення різних, в тому числі мукоадгезивних, стабільних, закріплених на носії форм лізоциму пролонгованої дії, перспективних для використання в медицині, є актуальною.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Дисертаційна робота виконувалася протягом 2010-2019 років у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України.

2.1. Матеріали і прилади, використані для дослідження

Матеріали

Лізоцим яєчного білка	«Sigma-Aldrich Co.» (США)
гліцерин	«Тор» (Україна)
хлоргексидину біглюконат	ООО «Фармація» (Україна)
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC № 4698	«Sigma-Aldrich» (США)
желатин харчовий	
карбоксиметилцелюлози натрієва сіль	ГОСТ 11253 – 89
полівініловий спирт	«FMC Biopolymer» (Ірландія), «Sigma-Aldrich» (США)
високоочищений гіалуронат натрію	"Sigma" (США)
декстран	
гідроксиметилпропілцелюлоза	
кверцетин	«Merck» (Німеччина)
Натрію хлорид	«Химреактив» (Росія)
Лимонна кислота	«Тор» (Україна)
Гліцерин	«Тор» (Україна)
Sephadex G 50, дрібнозернистий	«Pharmacia Fine Chemicals», (Швеція)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 F-49	Музейні тест-штами
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 415	
<i>Escherichia coli</i> 055 K59912 / 4	

Candida albicans ATCC 885-653

Прилади:

Мас - спектрометр «Autoflex II LRF 20 Bruker Daltonics»

Центрифуга Heraeus Labofuge 400 R Centrifuge

Водяна баня з вбудованим шейкером GFL 1083

Термостат ITM, ТУ 64-1-3229-80

pH / Ion metr Mettler Toledo SevenCompact S220

Спектрофотометр Agilent Cary 60 UV-Vis

Спектрофлуориметр Cary Eclipse «Varian» (Австралія) з ксеноновою лампою 150 W

Об'єктний мікрометр Pocket Thickness Gage (Mitutoyo INACTIVE)

Аналізатор текстури TAXT2 «Stable Microsystems»

Мішалка магнітна US-1500 A ULAB

Терези аналітичні ВЛР-200

Вертикальна система електрофорезу/настільна VS20WAVE MAXI

Капілярний візкозиметр Оствальда

Лабораторний рефрактометр ІРФ-454Б2М

Осмометр Tear Lab Osmolarity System

Скануючий електронний мікроскоп Zeiss EVO 50XVP

Мікроскоп Біолам 70

2.2 Визначення білка

Метод Лоурі в модифікації Хартрі [128]:

До 1,0 см³ розчину білка (5-125 мкг/см³) додавали 0,9 см³ реактиву А (в 1 дм³ розчину міститься 2 г К-Na тартрату, 100 г карбонату натрію і 20 г гідроксиду натрію). Розчин перемішували і інкубували 10 хв при 50 °С, після чого охолоджували до кімнатної температури і вводили 0,1 см³ реактиву В (в 100 см³ розчину міститься 2 г К-Na-тартрату, 1 г сульфату міді і 400 мг гідроксиду натрію).

Розчин перемішували і інкубували 10 хв при кімнатній температурі, після чого вводили 3,0 см³ реактиву Фоліна-Чокальтеу, розведеного дистильованою водою в 13 раз. Суміш перемішували і інкубували 10 хв при 50 °С, далі охолоджували до кімнатної температури і фотометрували при λ 650 в кюветі з довжиною ходу променя 1 см на спектрофотометрі Agilent Cary 60 UV-Vis.

У контроль вносили 1 см³ дистильованої води. Калібрувальний графік будували по бичачому сироватковому альбуміну (БСА), стандартизованому при 280 нм, відповідно до $E_{1\text{см}}^{1\%}=6,6$.

Вміст білка в зразках визначали за формулою:

$$nK = 194,087 \times Di - 17,740, \text{ мкг}$$

де Di - оптична густина зразка

Метод Брадфорда [129]:

до 1,0 см³ розчину білка (5-100 мкг / см³) додавали 4 см³ реактиву, суміш збовтували і фотометрували при $\lambda = 595$ нм в кюветі з довжиною ходу променя 1 см на спектрофотометрі Agilent Cary 60 UV-Vis. Калібрувальний графік будували по БСА.

Приготування реактиву: 50 мг Кумасі G-250 розчиняють в 62,5 см³ етилового спирту, вводять 125 см³ 85% фосфорної кислоти, і розбавляють

дистильованою водою до 1 дм³.

$$nK = 95.028 \times Di - 9.320, \text{ мкг}$$

де Di – оптична густина зразка,

$$D_{\text{гран}} = 0,729$$

Спектрофотометричний метод визначення вмісту білка [130]: визначали оптичну густина аналізованого розчину білка при $\lambda = 280$ нм в кюветі з довжиною ходу променя 1 см на спектрофотометрі Agilent Cary 60 UV-Vis, приймаючи, що для 1% розчину лізоциму $E_{280}^{1\% 1\text{ см}} = 26,3$.

2.3 Визначення гідролітичної активності лізоциму

Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом в натрій-фосфатному буферному розчині (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , pH 6.2, 0.1 моль / дм³), використовуючи як субстрат *Micrococcus lysodeikticus* [131].

У кювету спектрофотометра вносили 3,75 см³ розчину субстрату, прогрітого до 25 °С з 0,15 см³ розчину лізоциму, що містить 200-400 од ферменту. Реєстрували показання спектрофотометра при довжині хвилі 450 нм на п'ятій хвилині.

За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, що призводить до зменшення оптичної густини суспензії клітин *Micrococcus lysodeikticus* на 0,001 одиницю за 1 хв.

Гідролітичну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{Di \cdot 1000}{\tau \cdot m}, \text{ де}$$

A – гідролітична активність;

Di – різниця оптичної густини $D_K - D_3$;

τ – час реакції, хв;

m – маса ферменту в реакційній суміші.

2.4 Виділення і очищення лізоциму з білка курячих яєць

Фермент виділяли за модифікованим нами методом В.Я. Мікельсона [132]: ретельно вимиті яйця обробляли спиртом, відокремлювали білок від жовтка з відокремленням наявних халаз. Отриманий білок розбавляли в п'ять раз 0,5% розчином хлориду натрію, підкислювали до рН 4,4 - 4,6 і кип'ятили протягом 4 хв для коагуляції домішкових протеїнів.

Далі суміш нейтралізували K_2CO_3 до рН 7,0 - 7,2, і надосадову рідину, що містить лізоцим, відокремлювали центрифугуванням (4000g, 20 хв, 4 °C). Супернатант піддавали 3-х кратному діалізу проти 50 об'ємів дистильованої води при 4 °C.

На кожній стадії виділення контролювали вміст білка і гідролітичну активність ферменту. Отриманий розчин концентрували і висушували шляхом зворотного діалізу з сухим крохмалем для отримання кристалічної форми ензиму. Висушений ензим відділяли від гідратцелюлозної мембрани «Діацелл». Аналізували гідролітичну активність і визначали білок. Препарат зберігали герметично упакованим при -24 ° C.

2.5 Гель-хроматографія виділеного лізоциму

Гель-хроматографію виділеного з білка курячих яєць лізоциму проводили з використанням носія Sephadex G-50.

Sephadex G-50 заливали 100-кратним об'ємом води і залишали набрякати протягом 3 год. Потім набряклий носій кип'ятили для видалення бульбашок повітря і врівноважували 0,5 моль/дм³ трис-НСІ буферним розчином, після чого заповнювали колонку (1,5 × 50 см).

В колонку обережно вносили 1 см³ виділеного частково очищеного лізоциму, що містить 0,6 мг білка, уникаючи порушення шару носія. В отриманих фракціях елюата визначали білок і гідролітичну активність [133].

2.6 Визначення білково-фракційного складу ензиму методом електрофорезу в поліакриламідному гелі

Перед електрофоретичним розділенням виділений частково очищений лізоцим (1 мг білка / см³) розчиняли в 0,01 моль/дм³ натрій-фосфатному буферному розчині (рН 7,0), що містить 1% додецилсульфату натрію і 2-меркаптоетанол. Приготовану суміш кип'ятили 2 хв при 100 °С [134].

Електрофорез проводили у вертикальній системі Cleaver VS20WAVE MAX (Великобританія) в системі Леммлі в 10% поліакриламідному гелі [135].

Фіксацію і забарвлювання ензиму після електрофоретичного розділення здійснювали у водному розчині, що містить: Кумассі R - 250 - 0,1%, оцтова кислота - 10%, ізопропанол - 25%, формальдегід - 5%, етанол - 25%. Гелі відмивали 7% оцтовою кислотою до повного знебарвлення фону.

Кількісний аналіз електрофореграм проводили за допомогою комп'ютерної програми «Анаїс».

Молекулярні маси досліджуваного ензиму розраховували за калібрувальною кривою «відносна електрофоретична рухливість / lg молекулярної маси (кДа)», побудованої з використанням наступних маркерних білків: цитохром с (13 кДа), лізоцим (14,4 кДа), міоглобін (18 кДа), овальбумін (40 кДа), бичачий сироватковий альбумін (67 кДа) [136].

2.7 QSPR - аналіз впливу іонів металів на активність лізоциму

Вплив іонів металів вивчали, визначаючи гідролітичну активність лізоциму після сумісної інкубації через 10, 15, 30, 60 і 120 хв у 0,1 моль/дм³

буферному розчині імідазол-HCl (pH 6,2, 55 °C). Кінцева концентрація хлоридів металів (Li; Na; K; Cs; Mn (II); Fe (II); Co; Cu; Mg; Ca) в буферному розчині становила 5 ммоль/дм³. Гідролітичну активність визначали згідно п. 2.2.3.

Для пошуку зв'язку «структура-властивість» використовували метод множинної лінійної регресії [137, 138]. Як дескриптори, що описують властивості іонів металів, аналізували близько 70 характеристик [139], в тому числі:

- ефективні заряди атомів в основному стані;
- ефективні заряди ядер для різних валентних станів атомів;
- потенціали іонізації елементів;
- енергії дисоціації для солей Cl;
- середні енергії зв'язків в молекулах типу MCl_x;
- електронегативність елементів за шкалою Полінга;
- термохімічні електронегативності;
- іонізаційні електронегативності елементів;
- довжини зв'язків в галогенідах типу MeCl_x;
- атомні радіуси;
- іонні радіуси;
- рекомендовані електронегативності елементів;
- спорідненість до електрону;
- основні термодинамічні характеристики;
- термодинамічні характеристики іонів і нейтральних молекул у водному розчині;
- енергія кристалічної решітки іонних сполук;
- стандартні електронні потенціали у водних розчинах та ін.

2.8 Оцінка взаємодії лізоциму з полімерами методом матрично активованої лазерної десорбції / іонізації

Мас-спектрометричні дослідження виконували на приладі Autoflex II («Bruker Daltonics», ФРН) згідно [140].

Матрицю на основі сінапової кислоти (Sinapic Acid (SA), «Fluka», Switzerland) готували наступним чином: 12 мг сінапової кислоти розводили в 1 см³ водно-ацетонітрильної суміші 1: 1 з додаванням 0,1% трифтороцтової кислоти. Розчин інкубували протягом 10 хв при температурі 30 °С в ультразвуковій бані до повного розчинення кислоти.

Аналізували сумарні спектри позитивних іонів, отримані накопиченням 600 одинарних спектрів.

Дослідження проводили в масовому діапазоні 10-140 кДа. На всіх рисунках в обговоренні результатів представлені тільки інформативні ділянки мас-спектрів.

2.9 Вивчення гідролітичної активності лізоциму в присутності динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти

Готували водні розчини динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти в різних концентраціях: 0,5; 1; 2; 5 моль/дм³. Гідролітичну активність лізоциму визначали згідно п. 2.2.3, використовуючи замість буферного розчину перераховані вище розчини Na₂ЕДТА. У контрольний зразок замість Na₂ЕДТА додавали дистильовану воду.

2.10 Визначення кверцетину

Кверцетин визначали згідно [141]. До 5 см³ розчину кверцетину в 50% водному етанолі додавали 1 см³ буферного розчину. Потім додавали 1 см³ розчину хлориду цирконію, перемішували і фотометрували при 468 нм на

спектрофотометрі у кюветі з довжиною ходу променя 1 см. У контролі до 5 см³ 50% спирту додавали усі реактиви.

Приготування буферного розчину: в мірній колбі (100 см³) розчиняли 6,805 г тригідрату ацетату натрію, потім додавали 8,6 см³ льодяної оцтової кислоти, доводили до мітки і перемішували. Кінцева концентрація кислоти 1,5 моль/дм³, ацетату натрію 0,5 моль/дм³.

Приготування цирконієвого реактиву: в мірну колбу (100 см³) вносили 4,149 г октагідрату хлороксиду цирконію, розчиняли у воді і додавали 25,7 ммоль хлористоводневої кислоти, потім перемішували, доводили до мітки. Калібрувальну криву будували за кверцетином моногідратом.

Вміст кверцетину моногідрату в зразках визначали за формулою:

$$nK = 94,584 \times Di - 0,539, \text{ мкг}$$

де Di – оптична густина зразка.

2.11 Визначення біглюконату хлоргексидина

До 1 см³ досліджуваного розчину додавали 1 см³ 10% хлористоводневої кислоти і 1 см³ 5% розчину NaNO₂, витримували 15 хв на водяній бані при температурі 70 ° С, охолоджували водою, додавали 1,5 см³ 20% NaOH і 1 см³ 0,05% розчину α-нафтолу. Отриманий розчин струшували, нагрівали 5 хв при 70 ° С і визначали оптичну густина на спектрофотометрі при 506 нм [142].

Вміст біглюконату хлоргексидина в зразках визначали за формулою:

$$nK = 136,562 \times Di - 3,006, \text{ мкг}$$

де Di – оптична густина зразка.

2.12 Виготовлення препарату «штучна сльоза» з лізоцимом

Очні лізоцимвмісні краплі готували згідно розробленої методики наступним чином: змішували розчини 0,39 % гідроксипропілметилцелюлози (ГПМЦ), 0,1% лізоциму і 0,1% декстрану у відношенні 2: 1: 1, відповідно.

Суміш ретельно перемішували при кімнатній температурі. Як розчинник використовували фізіологічний стерильний розчин 0,9 % NaCl. Отримані краплі піддавали стерилізуючій фільтрації з використанням нітроцелюлозних фільтрів «Millipore» пористістю 0,45 мкм і зберігали герметично закритими при температурі 0-4 °С.

2.13 Імобілізація лізоциму включенням в гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози

Наважку натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) масою 3 г заливали дистильованою водою об'ємом 50 см³, перемішували і залишали набрякати 12 год при кімнатній температурі до утворення однорідного гелю. У приготований гель вносили розчин лізоциму (50 мг в 5 см³ води, кінцева концентрація ферменту в гелі 0,5 %), ретельно перемішували. Як добавки до складу гелю для проведення досліджень в області стоматології, додавали спиртовий екстракт м'яти перцевої (до 10 %), гліцерин (до 2 %), біглюконат хлоргексидину (до 2 %). Отриману суміш доводили розрахованим об'ємом дистильованої води до кінцевої концентрації Na-КМЦ 3 % і ретельно перемішували для рівномірного розподілу компонентів, після чого герметично упаковували і зберігали при температурі 4 °С.

Для отримання гелю з лізоцимом і кверцетином наважку кверцетину масою 200 мг попередньо розчиняли в суміші вода: спирт, взятих у співвідношенні 1: 2, потім вносили суспензію в гель з подальшим ретельним перемішуванням. Об'єм отриманого гелю 100 см³.

2.14 Включення лізоциму в ліпофільну мазеву основу

Включення лізоциму в мазеву основу проводили наступним чином: 1 г ланоліну і 4 г вазеліну розміщували в порцеляновій чашці і нагрівали на

водяній бані. Розплавлену мазеву основу проціджували через кілька шарів стерильної марлі, фасували в сухі простерилізовані скляні флакони, закупорювали і стерилізували в повітряному стерилізаторі при 180 °C протягом 30 хвилин. У готову мазеву основу (5 г) поступово вмішували водний розчин лізоциму, який містив 12,5 мг ензиму, до отримання гомогенної в'язкої суміші (без крапельок води) і зберігали при температурі 3-5 °C в захищеному від світла місці.

Гідролітичну активність лізоциму визначали вищеописаним методом.

2.15 Імобілізація лізоциму шляхом включення в гель желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з наступним отриманням плівок

Імобілізацію лізоциму проводили наступним чином: до 9 см³ 10% водного розчину желатину додавали 1 см³ водного розчину лізоциму в концентрації 0,1, 0,5, 1 % від желатину, перемішували протягом 20 хв при температурі 30 °C; потім додавали 1 см³ гліцерину і 1 см³ водного розчину Na-КМЦ в концентрації 0,5 % від желатину, з подальшим ретельним перемішуванням. Отриману суміш виливали на підкладку, висушували при кімнатній температурі. Після висушування висікали плівки діаметром 6 мм, обробляли 0,05 % розчином біглюконату хлоргексидину, герметично упаковували і зберігали при температурі 4 °C.

2.16 Кріоімобілізація лізоциму в полівініловий спирт

Кріоімобілізацію лізоциму проводили наступним чином: до 25 см³ 10% водного розчину ПВС додавали 8,8 см³ 0,1% водного розчину лізоциму при постійному перемішуванні протягом 30 хв. Для формування кріогелю суміш вносили в скляні чашки Петрі площею 63,6 см² і піддавали заморожуванню при -24 °C; витримували 24 години і розморозували, з

повторним циклом заморожування і розморожування згідно [143]. В результаті отримували пружний кріогель з іммобілізованим лізоцимом.

2.17 Визначення в'язкості розчинів полімерів

Вимірювання в'язкості водних розчинів полімерів проводили за допомогою віскозиметра Оствальда з діаметром капіляра 0,73 мм при температурі 37 ° С [144]. Концентрації аналізованих розчинів полімерів знаходилися в діапазоні від 0,05 до 0,25%. Після кожного вимірювання в'язкості розчину певної концентрації об'єм рідини видаляли з віскозиметра для промивання. Об'єм розчинника і розчинів були постійними і становили 15 см³. Вимірювання проводили не менше 10 раз.

Кінематичну в'язкість розраховували за формулою:

$$\eta_{\text{кінем.}} = \frac{g}{9,807} \cdot \tau \cdot k ,$$

где g – прискорення вільного падіння (9,81 м/с²);

k – константа приладу з капіляром 0,73 мм (становить 0,02826 гг²/с²).

2.18 Визначення величини мукоадгезії полімерних форм іммобілізованого лізоциму

Визначення адгезії отриманих плівок і гелю проводили на приладі TAXT2 («Stable Microsystems», Великобританія) згідно [145].

Як модель слизової оболонки використовували тканину тонкого кишківника свині. Перед експериментом тканину промивали фізіологічним розчином NaCl, висікали зразки слизової оболонки площею 5 см², однорідні за морфологією. В процесі експерименту досліджуваний об'єкт додатково зволожували фізіологічним розчином.

Зразок (мукоадгезивний гель з товщиною шару 3 мм або мукоадгезивну плівку) закріплювали на рухомому штоці і з'єднували зі слизовою. Фіксували навантаження на шток і час утримування (60 с). Далі під кутом 90 °С здійснювали відрив штока із закріпленим на ньому препаратом. Мукоадгезію розраховували як силу відриву штока від слизової оболонки.

$$A = \frac{m_1 + m_2}{S \times 1000}, \text{Па}$$

m_1 – маса протизваги;

m_2 – маса рівноважна;

S – площа поверхні, см^2 ;

1000 – перерахунок в кг.

2.19 Визначення фізико-хімічних характеристик вільного і іммобілізованих препаратів лізоциму

Для дослідження динаміки вивільнення ензиму з полімерної матриці однакові за активністю зразки іммобілізованого продукту інкубували при 37 °С. Через рівні проміжки часу протягом 3 год відбирали по 0,15 см^3 розчину і визначали гідролітичну активність.

Визначення рН-оптимуму активності лізоциму проводили, додаючи до однакових за активністю зразків, розчин субстрату і відповідні буферні розчини в концентрації 0,1 моль / дм^3 з різними значеннями рН (наприклад, цитратно-фосфатний (рН 3,0-6,0) і фосфатний (рН 7,0-10,0). Потім визначали гідролітичну активність.

Визначення температурного оптимуму функціонування вільного і різних форм іммобілізованого лізоциму проводили наступним чином: в однакових за активностями зразках вільного і іммобілізованого ензиму визначали гідролітичну активність в діапазоні температур 20 - 80 °С.

pH-стабільність оцінювали наступним чином: рівні за активністю зразки вільного і іммобілізованого лізоциму в буферному розчині з відповідним значенням pH інкубували при 37 °С протягом 30-180 хв, з подальшим визначенням гідролітичної активності.

Термостабільність лізоциму визначали при інкубації рівних за активністю зразків ензиму в Na-фосфатному буферному розчині (0,1 моль / дм³, pH 6,2) при температурі 80 °С протягом 6 год. Визначення гідролітичної активності ензиму проводили кожні 30 хв.

Зберігання розчинів або отриманих іммобілізованих препаратів лізоциму здійснювали при температурі 4 °С, визначаючи гідролітичну активність ензиму з необхідним інтервалом (день, тиждень, місяць).

2.20 Визначення кінетичних параметрів вільного і іммобілізованого лізоциму

Кінетичні параметри лізоциму визначали за початковими швидкостями лізису клітин *Micrococcus lysodeikticus*. На основі отриманих даних будували графіки в координатах Хейнса (S / V від S), де S - концентрація субстрату, $V_{\text{спост.}}$ -початкова швидкість реакції. Методом найменших квадратів визначали tg кута нахилу, чисельно рівний $1/V_{\text{max}}$. Значення точки перетину екстрапольованої прямої з віссю y становило відношення K_M / V_{max} , а точка перетину з віссю x - K_M .

Активність лізоциму 300 од/см³, концентрація клітин *Micrococcus lysodeikticus* 7 мкг-224 мкг / см³ згідно [146].

2.21 Технологія вологого гранулювання

Вологе гранулювання таблеткової маси проводили згідно Державної фармакопеї України [144]. Готували ряд наважок складових компонентів

таблетки і ретельно розтирали в ступці до їх подрібнення в тонкий порошок. Отриманий порошок просіювали через сито. Компоненти зволожували відповідним розчином полімеру, виступаючим як зв'язуюча речовина, після чого суміш гранулювали шляхом протирання одержаної маси через сита з діаметром пор 1,5; 2,0 і 3 мм. Застосовували пробивні сита з нержавіючої сталі, стежачи за тим, щоб в таблеткову масу не потрапляли сторонні домішки. Отримані гранули розсипали тонким шаром на піддонах і підсушували на повітрі при кімнатній температурі до залишкової вологості в гранулах, що не перевищує 2%.

Після висушування гранулят зважували, визначали вміст компонентів і зберігали герметично упакованим при температурі 4 ° С.

2.22 Визначення активності еластази

Активність еластази оцінювали за ступенем гідролізу синтетичного субстрату Nt - ВОС-L-аланін *n*-нітрофенілового ефіру (ВОС). Під дією еластази ротової рідини від субстрату відщеплюється *n*-нітрофенол жовтого кольору, інтенсивність якої пропорційна активності еластази [147].

У пробірки вносили по 1,9 см³ 0,05 М фосфатного буферного розчину (рН 8,5) і додавали 1 см³ ротової рідини. Пробірки інкубували на водяній бані з температурою 25 °С 10-15 хв. Після цього піпеткою вносили 0,1 см³ розчину субстрату ВОС, швидко перемішували і вимірювали оптичну густину на «нульовий» і на 5 хвилині. Показання знімали на спектрофотометрі при 347 нм проти фосфатного буферного розчину. Паралельно ставили контроль на спонтанний гідроліз ВОС, в якому 1 см³ ротової рідини замінювали відповідною кількістю фізіологічного розчину.

Активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{(E_5 - E_0) - E}{1,0 \cdot K \cdot 300} \text{ мк-кат/дм}^3, \text{ де}$$

E_0 _оптична густина на 0 хв;

E_5 – оптична густина на п'ятій хв;

E – контроль на ВОС;

1,0 – об'єм ротової рідини в см^3 ;

1000 – перерахунок см^3 в дм^3 ;

300 – час інкубації в сек;

K – коефіцієнт перерахунку значення оптичної густини в концентрацію n -нітрофенола.

Активність еластази виражали в мікрокаталах в дм^3 ротової рідини. 1 катал - це активність еластази, що каталізує відщеплення 1 моля n -нітрофенолу за 1 с.

2.23 Визначення активності уреаз

Активність уреаз визначали згідно [147].

До 1 см^3 3% розчину сечовини додавали 1 см^3 досліджуваного ферментного розчину в 0,06 моль / дм^3 фосфатному буфері рН 6,8. Реакцію проводили в термостаті при струшуванні (37°C). Попередні дослідження показали, що в цих умовах накопичення продуктів реакції має лінійний характер протягом 15 - 30 хв. Кількість аміаку, що виділився в результаті реакції, визначали спектрофотометрично за допомогою реакції з реактивом Несслера при 490 нм.

Для побудови калібрувального графіка залежності ступеня поглинання при даній довжині хвилі від кількості аміаку в зразках використовували розчин хлористого амонію.

За одиницю уреазної активності приймали таку кількість ферменту, під дією якої на сечовину, при 37°C виділяється 1 мкмоль аміаку за хвилину.

2.24 Визначення концентрації малонового діальдегіду

Принцип методу [147] оснований на тому, що при нагріванні в кислому середовищі малоновий діальдегід (МДА) реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс, з максимумом поглинання при 532 нм. Молярний коефіцієнт поглинання цього комплексу $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$.

Відцентрифуговану ротову рідину розливали по $0,5 \text{ см}^3$ в центрифужні пробірки і осаджували білок додаванням $1,5 \text{ см}^3$ 0,75 % тіобарбітурової кислоти. Зразки ставили на 30 хв в киплячу водяну баню, після чого охолоджували. Осад відокремлювали центрифугуванням протягом 15 хв при 3000 об/хв. Як контроль використовували зразки, що містять $0,5 \text{ см}^3$ води. Вимірювали оптичну густину при 532 нм на спектрофотометрі проти контрольної проби.

Кількість МДА розраховували, використовуючи зазначену вище величину молярного коефіцієнта поглинання і отриманий результат виражали в мкмоль / дм^3 ротової рідини.

$$A = \frac{E \cdot 10^6 \cdot 1000}{1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,5} \text{ мкмоль/дм}^3, \text{ де}$$

E – оптична густина зразка;

0,5 – об'єм ротової рідини, що вноситься, в см^3 ;

$1,56 \cdot 10^5$ – молярний коефіцієнт поглинання;

10^6 – перерахунок моль в мікромолі;

1000 – перерахунок см^3 в дм^3 .

2.25 Визначення гіалуронової кислоти

Метод оснований на турбідиметричному визначенні гіалуронової кислоти за Клементом [148]

До 2 см^3 досліджуваного розчину додавали 5 см^3 овальбуміну, доводили рН ацетатним буферним розчином до рН 4,2 так, щоб кінцева концентрація суміші дорівнювала 0,2 н і через 10 хв фотометрували з синім

світлофільтром. Кількість гіалуронової кислоти визначали за калібрувальною кривою у діапазоні 10-100 мкг речовини.

2.26 Визначення чутливості мікроорганізмів до діючих компонентів таблетних сумішей

Музейні види культур мікроорганізмів засівали на середовище Мюллера-Хінтона і Сабуро на чашках Петрі діаметром 6 см.

$1 \times 10^{-3} \text{ см}^3$ досліджуваного зразка наносили «доріжкою» на засіяні культури. За зонами просвітлення визначали чутливість мікроорганізмів до зразка. Просвітлення на чашці Петрі в місці нанесення препарату свідчить про високу чутливість мікроорганізмів. Зона просвітлення з окремими колоніями свідчить про затримку росту даного мікроорганізму. Чашка Петрі з засіяною культурою мікроорганізму без зони просвітлення - резистентний до даних препаратів штам [149].

У роботі використовували музейні штами *E.coli*, *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *C. albicans* колекції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

2.27 Оцінка антимікробної дії різних форм іммобілізованого лізоциму

Антимікробну активність іммобілізованого лізоциму визначали методом дифузії в агар [144] на стандартному живильному середовищі АГВ (для визначення чутливості м/о до антибіотиків) і характеризували зоною затримки росту мікроорганізмів при навантаженні мікробної флори $1,5 \cdot 10^8$ колонієутворюючих одиниць (КУО) / см^3 . Були використані музейні штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K59912 / 4, *Candida albicans* ATCC 885-653. Суспензію клітин рівномірно наносили на поверхню чашок Петрі з

живильним середовищем, потім на поверхні моношару на однаковій відстані один від одного розміщували препарати з лізоцимом (площа тестованого зразка 0,64 см²). Після аплікації препарату з лізоцимом чашки Петрі інкубували при 37 °С в термостаті 18-24 год (в залежності від виду мікроорганізмів). Про антимікробну активність судили за величиною діаметра зони затримки росту (д.з.з.р.).

Дослідження препарату з лізоцимом на стерильність проводили в аеробних і анаеробних умовах.

2.28 Вивчення офтальмонешкідливості лізоцимвмісних очних крапель

Дослідження офтальмонешкідливості очних крапель проводили згідно [150] за даними кон'юнктивальної проби на 3 морських свинках масою 250-300 г, з чистою, негіперемованою кон'юнктивою. Кожній морській свинці в праве око інстилювали тестуємі очні краплі, а в ліве (контрольне око) - фізіологічний розчин.

При зовнішньому огляді облік можливої реакції проводився через 15 хв, 1 год, 24 год, 48 години після інстиляції.

2.29 Вивчення фармакотерапевтичної ефективності очних крапель «штучна сльоза» на моделі травматичного кератиту

Доклінічне вивчення протизапальних та регенераційних властивостей очних крапель проводили відповідно до методичних рекомендацій [150].

Досліди проводили на 6 статевозрілих здорових кроликах породи Шиншила, обох статей, масою 2,2-2,5 кг, у віці 6-7 місяців. Тварин утримували в умовах віварію ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» в індивідуальних клітках, при температурі

20-25 °C, вологості не більше 50%, природному світловому режимі «день-ніч», на стандартному харчовому раціоні.

Відтворення травматичного кератиту здійснювали за стандартною методикою [23]. Під місцевою анестезією (0,4% розчин інокаїну) за допомогою хірургічного трепана діаметром 6 мм проводили кільцевий дозований надріз рогівки в області зіниці обох очей кролів. Під контролем флуоресцеїнової (1% розчин) опалесценції офтальмологічним скальпелем здійснювали видалення епітелію в межах насічки, не зачіпаючи стромальні шари.

Кролі були розподілені порівну на 2 групи: дослідну - щоденні інстиляції очних крапель «штучна сльоза» з лізоцимом по 2 краплі 3 рази на день і контрольну - інстиляції 0,9 % фізіологічного розчину в тому ж режимі. Інстиляції випробовуваних розчинів проводили до повного загоєння дефекту рогівки.

Критеріями оцінки фармакотерапевтичної ефективності досліджуваних очних крапель були наступні:

- 1) етапи ранозагоєння - зменшення площі ерозії рогівки та строки її повної епітелізації;
- 2) динаміка інтенсивності запальної реакції на різних етапах загоєння рогівки.

Дослідження проводилися щодня вранці, в один і той же час. Оцінку стану очей проводили методом бокового фокального освітлення і біомікроскопічного на щілинній лампі ЩЛ-2Б (ЛОМО). Площу деепітелізованої зони рогівки визначали після закапування 1% розчину флуоресцеїну шляхом фотографування цифровою камерою. За отриманими зображеннями на екрані монітора зону ерозії обводили курсором і виражали в відносних одиницях (пікселях) за допомогою програми Myltispec. Для обчислення площі деепітелізованої зони рогівки здійснювали перерахунок отриманих даних на мм². Інтенсивність запальної реакції оцінювали за тестом

Дрейза.

2.30 Оцінка біологічної дії мукоадгезивного гелю з лізоцимом і кверцетином на основі Na-КМЦ

Лікувально-профілактичну дію комплексного гелю досліджували на щурах, у яких викликали гінгівіт за допомогою індометацину. Для цього щурам лінії Вістар інтрагастрально вводили 10 мг / кг індометацину (виробництво АТ «Софарма», Болгарія). Через 24 години тварини піддавалися евтаназії під тіопенталовим наркозом (20 мг / кг) шляхом тотального кровопускання з серця. Всі тварини були поділені на 5 груп по 7 голів у кожній: 1 група - контроль, 2-5 групи - отримували індометацин, 3 група - за три доби до введення індометацину отримувала аплікацію гелю з вмістом лізоциму 5 мг/см³, 4 група - з вмістом кверцетину 2 мг/см³ і 5 група - гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином (5 і 2 мг/см³, відповідно).

Аплікації гелів робили щодня за 30 хв до годування. У гомогенаті ясен визначали вміст малонового діальдегіду, активність еластази, активність уреаз, активність лізоциму, а також активність каталази. За відношенням активності уреаз до активності лізоциму розраховували ступінь дисбіозу [151]. За відношенням активності каталази до вмісту МДА розраховували антиоксидантно-прооксидантний індекс [147].

2.31 Оцінка біологічної дії лізоциму, іммобілізованого в кріогель полівінілового спирту

Оцінку біологічної дії лізоциму проводили згідно [93]. Дослідження були проведені на 30 щурах лінії Вістар (самці, вік 12 міс., середня жива маса 387 ± 12 г). Тварини були розділені на 6 груп: 1 - норма (інтактна), 2 -

контроль (без лікування), 3 - 6 групи - щури, яким наносили на слизову оболонку порожнини рота кріогель з лізоцимом, що містив досліджувані речовини: 3 - лізоцим, 4 - NaЕДТА, 5 - ХГБГ, 6 - комбінацію всіх трьох речовин.

Попередньо всі щури 2 - 6 групи отримували на СОПР аплікації $0,2 \text{ см}^3$ гелю з ліпополісахаридом (ЛПС) в концентрації $38,5 \text{ мкг/см}^3$, що відповідає дозі 30 мкг/кг . Через 30 хв після нанесення гелю з ЛПС здійснювали аплікацію кріогелю полівінілового спирту на СОПР.

У декапітованих тварин через 24 год під тіопенталовим наркозом (20 мг / кг) шляхом тотального кровопускання з серця, висікали слизову оболонку ясен і щоки в місцях накладення гідрогелевих плівок.

У гомогенатах СОПР (20 мг / см^3 $0,05 \text{ М}$ трис-НСІ-буфера, рН 7,5) визначали активність еластази, активність уреази, активність лізоциму, вміст малонового діальдегіду і активність каталази. Розраховували ступінь дисбіозу по Левицькому і антиоксидантний-прооксидантний індекс (п. 2.27). Крім цього, в гомогенаті ясен визначали вміст гіалуронової кислоти.

2.32 Оцінка біологічної дії мукоадгезивної плівкової форми імобілізованого лізоциму

Оцінку біологічної дії мукоадгезивних плівок з імобілізованим лізоцимом проводили згідно [93]. В дослідженнях *in vivo* використовували 42 щури лінії Вістар (самці, вік 15 міс).

У I серії біологічних експериментів на 18 інтактних тваринах перевіряли здатність імобілізованого лізоциму дифундувати з плівки в слизову оболонку щоки щурів. Через 10 і 30 хв аплікації МАП відсікали відповідну ділянку слизової оболонки порожнини рота (СОПР) під плівкою і в гомогенаті тканини визначали активність лізоциму.

У II серії біологічних досліджень на 24 щурах вивчали вплив МАП з

лізоцимом на перебіг запальних процесів в СОПР після моделювання стоматиту бджолою отрутою. Тварини були розділені на 3 групи по 8 щурів: 1 - контроль, 2 і 3 - експериментальний стоматит. У 3 групі на місце введення бджолою отрути накладали на 20 хв МАП. Через 2 доби тварин забивали під тіопенталовим наркозом ($20 \text{ }^{\circ} \text{ мг/кг}$) і в гомогенаті СОПР визначали рівень маркерів запалення: активність еластази, концентрацію малонового діальдегіду (МДА), показник мікробного обсіменіння тканин - активність уреазі, рівень неспецифічного імунітету за активністю лізоциму.

2.33 Оцінка біологічної дії таблетованих сумішей з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином

Експерименти проводили на 25 білих щурах лінії Вістар (самці, 1,2-1,5 року, середня жива маса $450 \pm 16 \text{ г}$), розподілених на 5 рівних груп:

- 1 - інтактна (норма),
- 2 - отримувала аплікації ЛПС на слизову порожнини рота,
- 3 - отримувала аплікації на слизову порожнини рота гелю, що містив «Лізак»,
- 4 - отримувала аплікації гелю, що містив лізоцим з кверцетином,
- 5 - отримувала аплікації гелю, що містив лізоцим з желатином.

Для фіксації таблетованих сумішей з іммобілізованим лізоцимом і референс-препарату «Лізак» на слизові оболонки порожнини рота щурів, препарати вводили в 3% гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози, який наносили на ділянку запалення експериментальним тваринам.

Аплікації проводили в дозі $0,5 \text{ см}^3$ гелю на щура протягом 3 днів за 30 хв до їжі. На третій день щури 3-й, 4-й і 5-ї груп через 30 хв після аплікації гелів з лізоцимом і щури 2-ї групи отримували аплікації гелю ЛПС в дозі $0,5 \text{ см}^3$ на щура. Евтаназію щурів здійснювали через 3 години після нанесення на СОПР гелю ЛПС під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) шляхом тотального

кровопускання з серця. Отримували сироватку крові і висікали слизову щоки і ясна. У сироватці крові і в гомогенатах слизової щоки і ясен визначали активність лізоциму, уреазі, еластази, каталази і вміст МДА. Розраховували антиоксидантно-прооксидантний індекс. Статистичну обробку результатів здійснювали відповідно до загальноприйнятої методики.

2.34 Статистична обробка експериментальних даних

Статистичну обробку експериментальних даних проводили, визначаючи середнє відхилення, середню стандартну помилку експерименту і t - критерій Стюдента згідно [152].

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІЗОЦИМУ З БІЛКА КУРЯЧИХ ЯЄЦЬ

Лізоцим (КФ 3.2.1.17) - один з перших виділених білків. Спочатку виділення ензиму здійснювали висолюванням сульфатом амонію, проте зміна рН і високі концентрації солі негативно впливали на активність ензиму. Виділений з використанням сульфату амонію лізоцим був стабільний в кислих умовах, але тільки частково розчинний в лужних умовах через утворення кристалів [23].

У 1984 р. для виділення ензиму використовували іонообмінну хроматографію із застосуванням карбоксиметилцелюлози як носія, що виявилось неефективним в періодичних процесах, внаслідок малого розміру часток і, відповідно, повільній швидкості потоку в колонці [153].

У 2007 р групою чеських вчених було запропоновано використовувати магнітну катіонообмінну великопористу целюлозу. Перевагою процесу є його одностадійність і чистота одержуваного ензиму (більше 96 %). Однак основний недолік даного методу - висока вартість обраного хроматографічного носія [30].

З метою отримання лізоциму також застосовувалися і нехроматографічні методи. Chang Н.М. з співавторами запропонували використання β -меркаптоетанолу, поряд з іншими хімічними речовинами для виділення лізоциму [154]. Однак цей метод не знайшов широкого застосування через денатурацію протеїну і токсичність β -меркаптоетанолу, що обмежувало застосування лізоциму в харчовій промисловості і медицині.

У 2006 р. J. Lu зі співавторами запропонували використання ультрафільтрації для виділення лізоциму. Метод дозволив отримувати ензим з чистотою і виходом 80%, проте ефективний для очищення лізоциму тільки в лабораторних масштабах [32].

Оскільки існуючі численні методи виділення лізоциму з білка курячих яєць (лізоцим с), а саме: хроматографічні [92, 155-157], ультрафільтрація [158-160],

розділення на основі молекулярного розпізнавання [161], за допомогою обернених міцел [162, 163], в двофазних системах [69, 164-166], магнітний розподіл [167-169], метало-афінне осадження [170-172], адсорбція на рослинних відходах [173] і інші мають ряд недоліків, пошук, розробка та удосконалення нових методів отримання високоочищеного лізоциму є актуальним завданням біотехнології.

3.1 Розробка способу виділення високоочищеного лізоциму з білка курячих яєць

Більшість світових фармацевтичних компаній (Sigma-Aldrich, Pharmaceuticals Inc., Applichem) використовують для виділення лізоциму білок курячих яєць. Ця сировина найбільш доступна, містить достатню кількість лізоциму, який вважається стандартом (еталоном). Крім лізоциму основними білками яйця є овальбумін (54%), овотрасферин (12%), овомукоїд (11%) і овомуцин (3,5%) [23].

Детально ознайомившись з перевагами і недоліками існуючих методів виділення і очищення лізоциму ми запропонували модифікацію способу виділення ензиму за В.Я. Мікельсоном [132], схема якого представлена на рис. 3.1.

Модифікація полягає в наступному:

- проведення п'ятикратного розведення білка (замість 30-кратного) з подальшим висолюванням неденатурованих білків 5% розчином карбонату натрію;

- введення додаткових трьох стадій діалізу для видалення низькомолекулярних домішок;

- проведення стадії зворотного діалізу з сухим крохмалем з метою отримання ензиму в кристалічному вигляді.

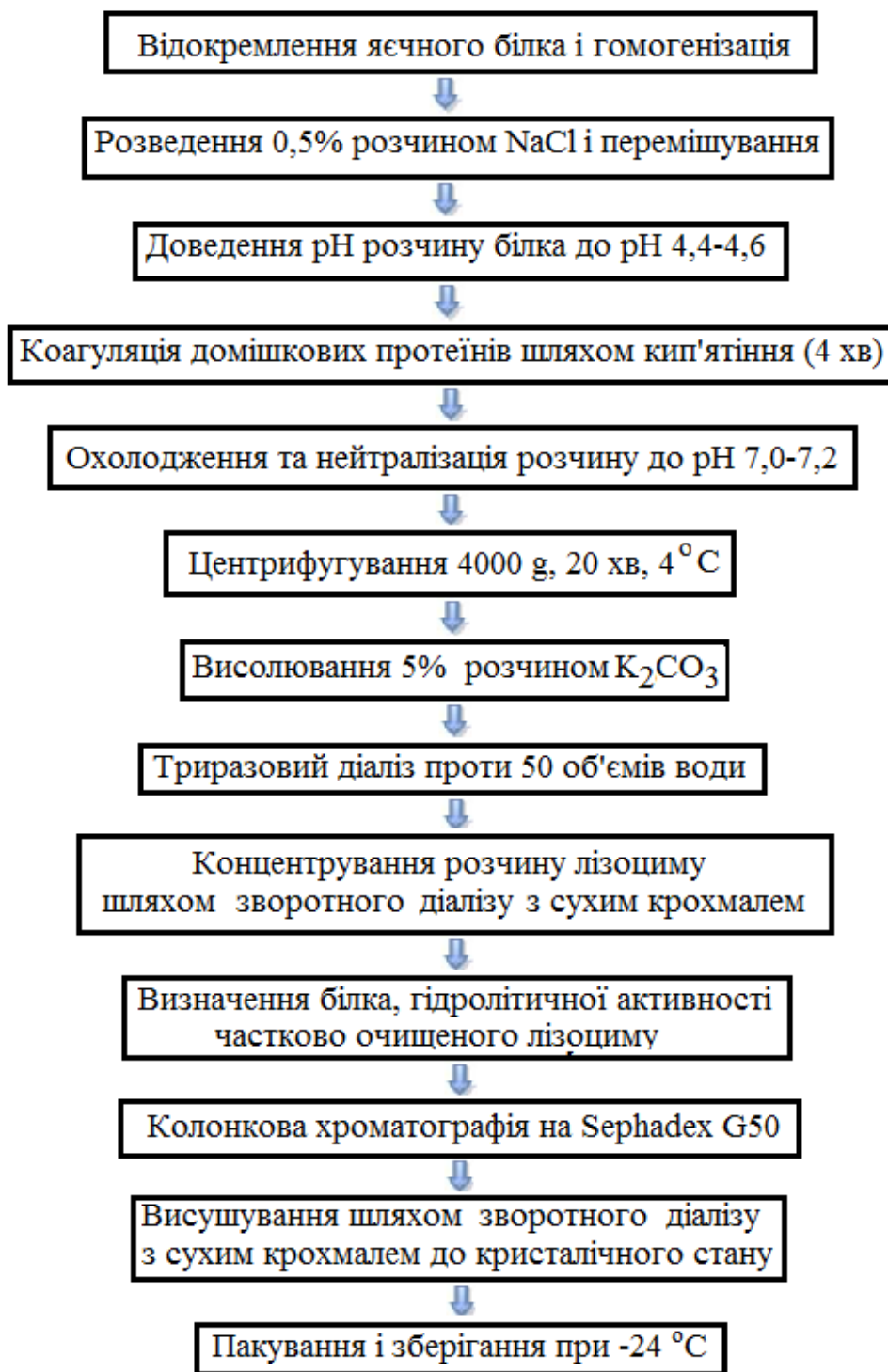


Рис. 3.1. Схема виділення лізоциму з білка курячого яйця

Основні результати виділення ензиму представлені в таблиці 3.1. У процесі визначали об'єм відокремленого і загальний вміст білка в яйці, в супернатанті, після діалізу, а також вихід від загального білка і активність лізоциму.

Таблиця 3.1.

Чисельні параметри виділення лізоциму

Параметр, од. вим.	Показник*, M±m
Об'єм відокремленого яєчного протеїну з 1 яйця, см ³	35,0±5,5
Загальний вміст протеїну в яйці, мг	5410,0±380,6
Маса отриманого кристалічного лізоциму, мг	170,2±3,0
Вміст протеїну в виділеному ензимі, %	100,0 %
Гідролітична активність отриманого препарату, од / мг	22025±1500
Вихід продукту від загального білка, %	3,15±0,16 %

* 0,02<P<0,05 порівняно з контролем (комерційний препарат) при n=5.

Слід зазначити, що після стадії триразового діалізу проти дистильованої води виділено частково очищений ензим, що містить, крім лізоциму, домішки інших протеїнів. Так, мас-спектр MALDI (рис. 3.2), демонструє наявність піків зі значенням близько 14214 m/z, 28206 m/z, 56682 m/z і 85023 m/z, що обумовлює необхідність додаткової стадії очищення ензиму, для здійснення якої обрали метод гель-хроматографії.

Носій Sephadex G – 50 було обрано, враховуючи межі фракціонування глобулярних білків за величиною молекулярної маси, що для даного носія знаходяться в діапазоні 1500 – 30000 Да. [148].

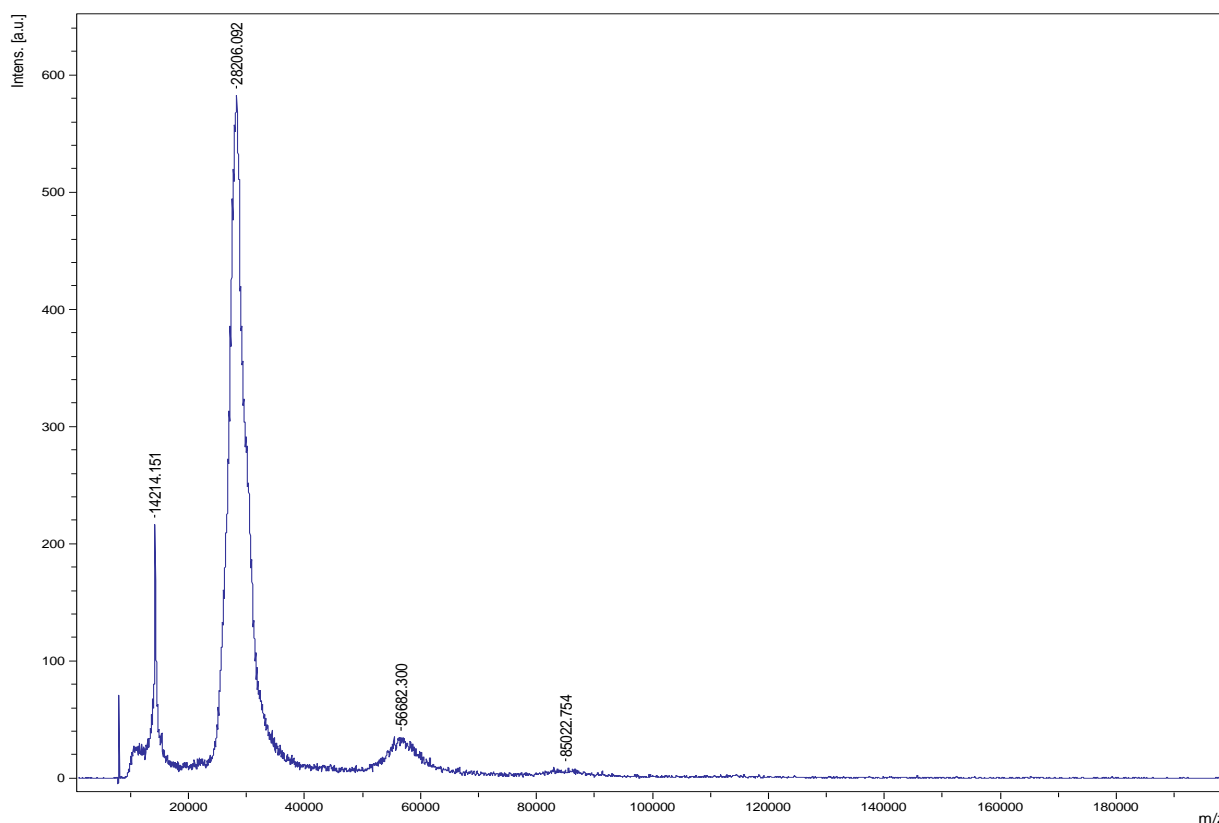


Рис. 3.2. Мас-спектр MALDI частково очищеного лізоциму після стадії триразового діалізу

Застосування гель-хроматографії з використанням дрібнозернистого Sephadex G - 50 (рис. 3.7) привело до розподілу білків частково очищеного препарату і отримання лізоциму високого ступеня чистоти, про що свідчать результати мас-спектрометрії MALDI.

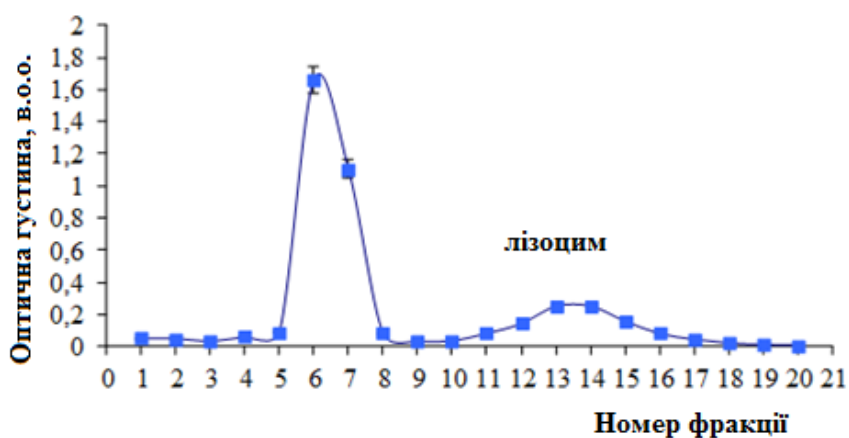


Рис. 3.3. Хроматографія частково очищеного лізоциму на колонці з Sephadex G-50

MALDI – спектр очищеного ензиму показав наявність одного піка зі значенням m/z близько 14181 (рис. 3.8), що відповідає значенню m/z еталонного лізоциму «AppliChem» (рис. 3.9).

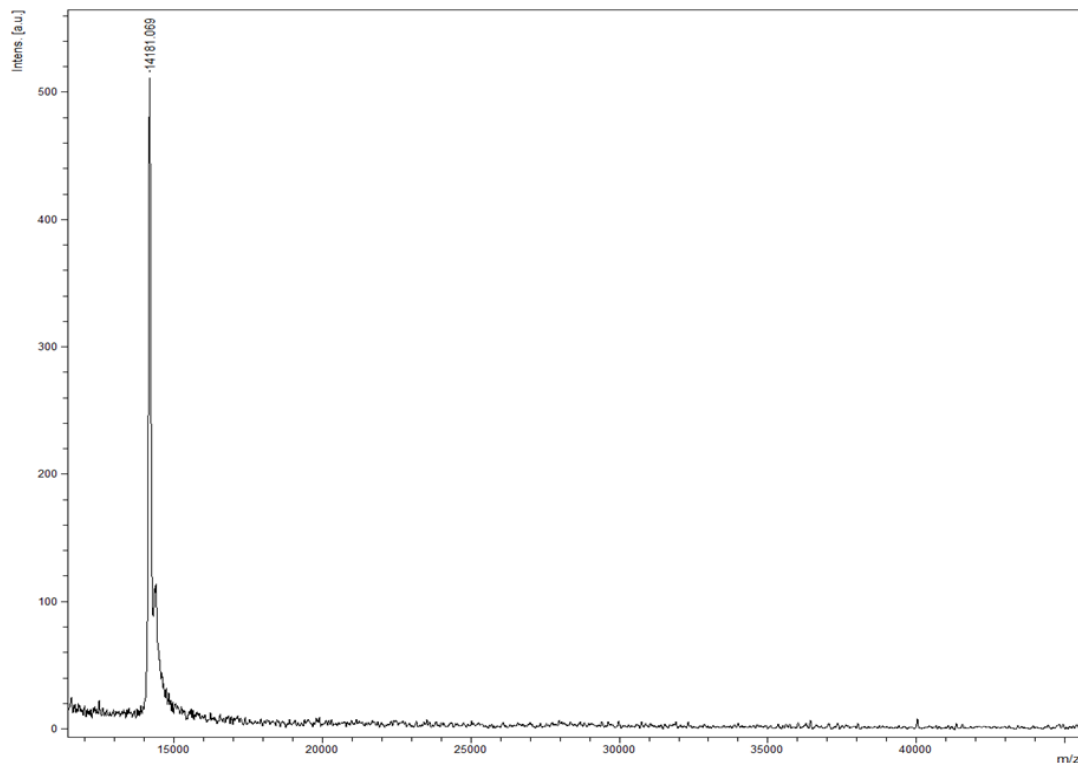


Рис. 3.4. Мас-спектр MALDI виділеного очищеного лізоциму

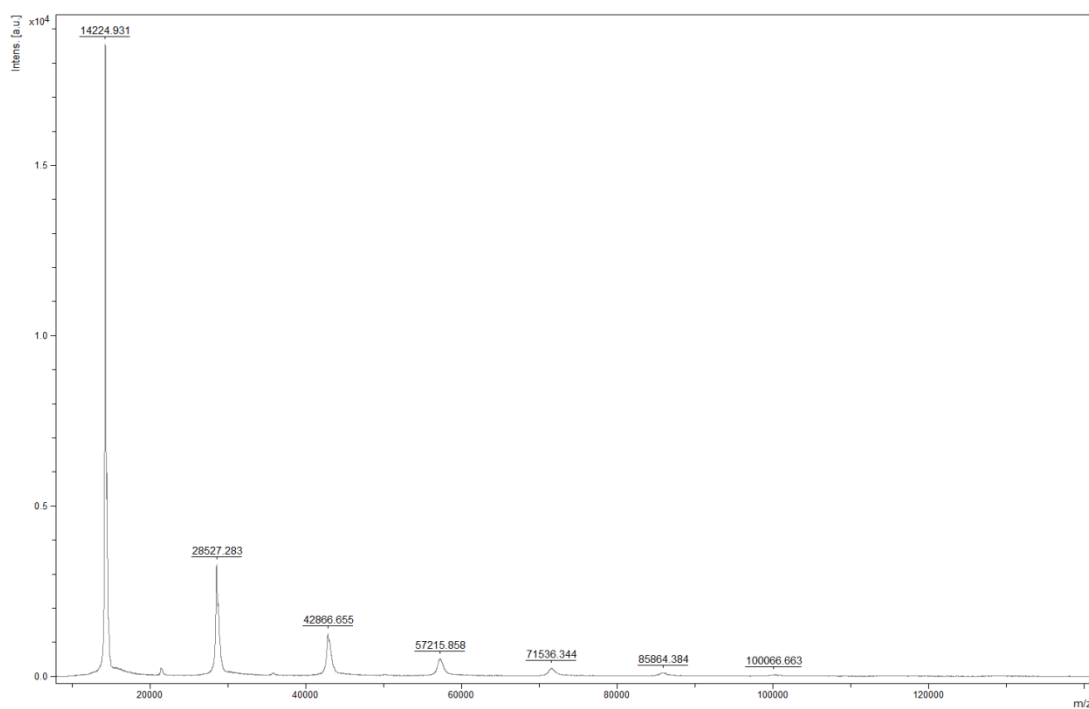


Рис. 3.5. Мас-спектр MALDI лізоциму «AppliChem»

Слід також зазначити, що у водному розчині комерційного ензиму спостерігається присутність асоціатів, що можливо обумовлено ліофільним висушуванням препаратів.

Згідно з результатами SDS-електрофорезу в 10 % ПААГ, найбільш інтенсивна смуга знаходиться в діапазоні М.м. від 12 до 17 кДа і чистота виділеного лізоциму становить 95-98% (рис. 3.6). Для порівняння цілісний білок курячого яйця представлений на електрофореграмі широким набором протеїнів різної молекулярної маси від 10 до 80 кДа і вище.

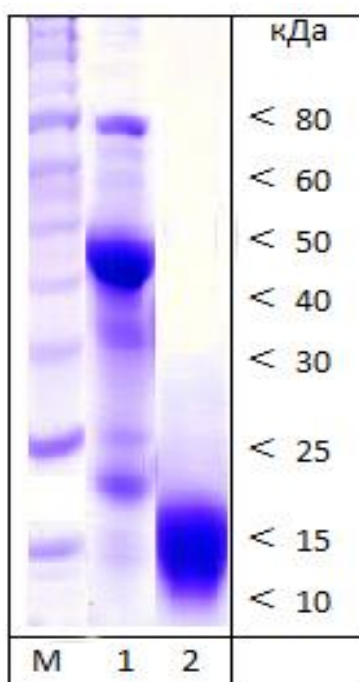


Рис. 3.6. SDS-електрофорез лізоциму в 10% ПААГ. М - маркери, 1 - цілісний протеїн курячого яйця, 2 - очищений лізоцим

З метою отримання ензиму в кристалічній формі розчин концентрували і висушували методом зворотного діалізу з сухим крохмалем. В результаті виділення і очищення лізоциму отримані безбарвні прозорі пластинчасті кристали ферменту (рис.3.7).

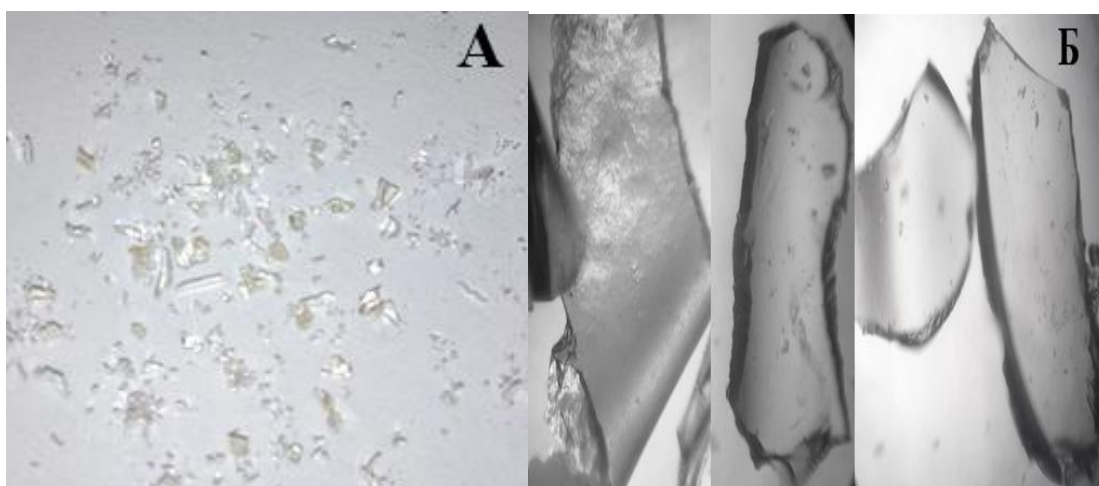


Рис. 3.7. Мікрофотографії виділеного лізоциму (збільшення А×8, Б×120)

Дослідження фізико-хімічних властивостей комерційного і виділеного лізоциму свідчить про збіг рН і термооптимумів гідролітичної активності і питомої активності. Так, отриманий продукт зберігає гідролітичну активність протягом 9 міс. при температурі $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (табл. 3.2). Збільшення строків зберігання виділеного лізоциму можливе при застосуванні ліофілізації продукту.

Таблиця 3.2.

Характеристика основних властивостей комерційного і виділеного лізоциму

Показник	Лізоцим*	
	«AppliChem»	виділений*
Активність*, од/мг, $M \pm m$	20000 ± 5000	22025 ± 1500
рН-оптимум	6,0	6,0
Термооптимум, оС	$55\text{ }^{\circ}\text{C}$	$55\text{ }^{\circ}\text{C}$
Константи термоінактивації при $80\text{ }^{\circ}\text{C}^*$, хв^{-1}	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$4,7 \cdot 10^{-3}$
Строки зберігання ензиму при $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, міс	24	9

* – $P < 0,05$ при $n=5$

Таким чином, в результаті модифікації методу В.Я. Мікельсона, отриманий лізоцим з протеїну курячого яйця з виходом 3,2 % і активністю 22025 ± 1500 од / мг. Методами мас-спектрометрії і SDS-електрофорезу в 10 % ПААГ підтверджена чистота виділеного ензиму, що становить ~ 95-98 %, запропонований метод є економічним і доступним для реалізації в лабораторних умовах.

Запропонована модифікація методу В.Я. Мікельсона для виділення лізоциму дозволяє отримувати в кристалічному вигляді стабільний активний ензим з протеїну курячого яйця в лабораторних умовах, що відрізняється високим ступенем чистоти, перспективний для використання в біотехнології.

3.2 Дослідження впливу іонів лужних, лужноземельних і перехідних металів на гідролітичну активність лізоциму

Незважаючи на досить високу стабільність, ензим частково або повністю втрачає гідролітичну активність в присутності іонів металів. З даних літератури відомо про вплив деяких катіонів (Zn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , тривалентні іони лантанідів та ін.) на активність лізоциму. Дослідження, описані в літературі, проводили з використанням методів денситометрії, віскозиметрії, спектрометрії, рефрактометрії, мікрокалориметрії, рентгеноструктурного аналізу [21, 174-177].

Оцінити внесок фізико-хімічних параметрів, що описують властивості іонів металів, у втрату активності лізоцимом, ми спробували вперше за допомогою QSAR аналізу (Quantitative Structure Activity Relationship). Подібні дослідження були проведені для карбоксилестерази печінки свині, що дозволило з високим ступенем ймовірності прогнозувати активність ферменту в присутності іонів металів [138].

Раніше в літературі метод QSAR-аналізу успішно використовували для пошуку зв'язку структура-властивість в системі «лізоцим-біофлавоноїди» [175].

Дослідження впливу 16 хлоридів металів на гідролітичну активність лізоциму показало, що їх додавання до розчину ензиму і витримування протягом 2 год, у всіх випадках призводить до зниження ферментативної активності.

Найнижча гідролітична активність спостерігається при взаємодії лізоциму з катіонами тривалентних металів лантану La^{3+} (33,0%), алюмінію Al^{3+} (14,3%), двовалентного заліза Fe^{2+} (37,8%) і літію Li^{+} (34,8%) (рис. 3.8). Пригнічення активності ферменту у випадку з залізом можливо відбувається через зміни валентності катіона з Fe^{2+} на Fe^{3+} , а Li^{+} (на відміну від Na^{+} і K^{+}) належить до біологічно активних катіонів, що утворює з лізоцимом міцний комплекс, істотно змінюючи конформацію білкової молекули, згідно даних літератури [178]

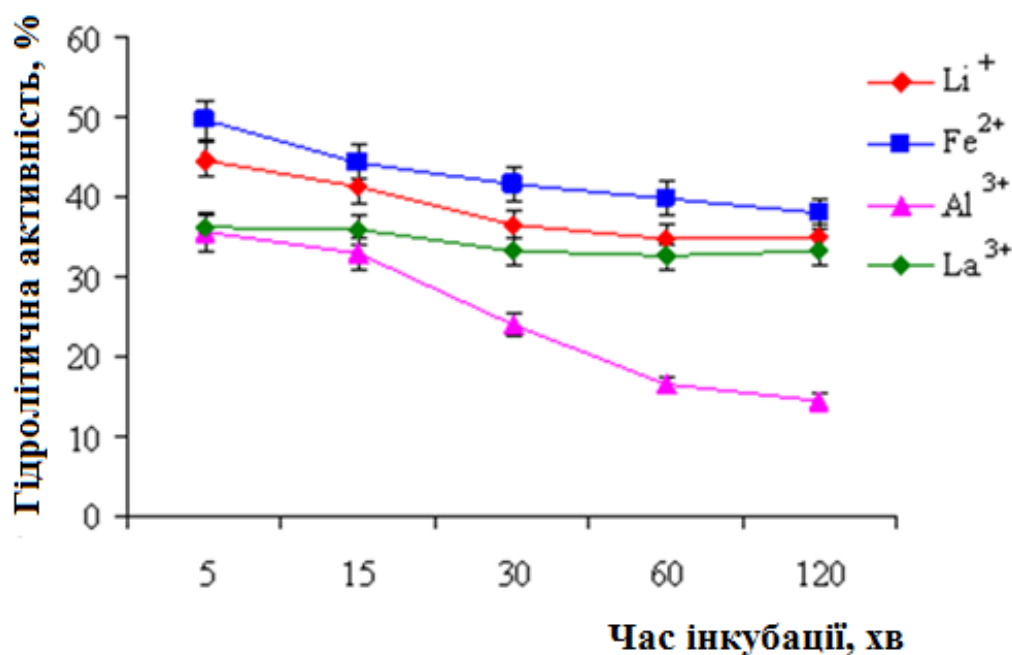


Рис. 3.8. Залежність гідролітичної активності лізоциму в присутності катіонів La^{3+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Li^{+} від часу інкубації в 0,1 М буферному розчині імідазол- HCl (pH 6,2, 55 °C)

Як показано в роботі [176], іони металів знижують ефективність перетворення субстрату в активному центрі лізоциму внаслідок можливого

конкурентного інгібування, а також ймовірного зв'язування поза активним центром з вільними функціональними групами, що впливають на каталітичні властивості ферменту [179].

Для кількісної оцінки впливу іонів металів на каталітичну активність лізоциму був застосований метод покрокової лінійної регресії [137].

Вся вибірка була розділена на дві групи: навчальну (13 іонів) і тестову (3 іони). У тестову вибірку були віднесені випадкові іони металів з різних груп (Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+}).

В результаті досліджень була отримана адекватна 3-х параметрична QSPR модель, що описує гідролітичну активність лізоциму ($A, \%$) в присутності хлоридів металів:

$$A = -173 + 0,52 S^\circ + 151 \text{EN} - 0,22 \Delta fH^\circ, \text{ де}$$

EN – електронегативність за Полінгом,

S° , ΔfH° – ентропія і ентальпія іонів металів у водному розчині.

Статистичні характеристики моделі наступні:

- коефіцієнт кореляції $R=0,89$;
- середньоквадратична помилка прогнозування $SE=9,2$;
- критерій Фішера $F=12,56$, що перевищує критичне значення ($F_{\text{кр}}=7,49$) для рівня значущості 0,99.

Модель також є стійкою (коефіцієнт кореляції в умовах змінного контролю $Q^2 = 0,66$), має хорошу здатність прогнозування ($R^2_{\text{test}} = 0,96$).

Спостережувані і прогнозовані значення збереження гідролітичної активності лізоциму в присутності хлоридів металів і вихідні значення структурних параметрів, задіяних в отриманій регресійній моделі, представлені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3.

Спостережувані і прогнозовані значення гідролітичної активності лізоциму і вихідні значення структурних параметрів, задіяних в отриманій регресійній моделі

Катіон	Спостережувана активність лізоциму, А, %, $M \pm m$	Ентропія іонів в водному розчині, S°, Дж/моль·К	Електронегативність за Полінгом, EN	Ентальпія іонів металів у водному розчині, ΔfH°, кДж/моль	Прогнозована активність, А, %
Li^+	34,8±2,4	13,4	1,0	278,5	42,2
Na^+	67,4±3,4	59,0	0,9	-240,1	50,2
K^+	50,0±2,5	102,5	0,8	-252,4	59,0
Cs^+	73,6±3,7	133,1	0,8	-258,3	71,8
Mn^{2+}	70,9±3,5	-73,6	1,6	-220,8	70,1
Fe^{2+}	37,8±1,9	-137,7	1,8	-89,1	50,1
Co^{2+}	72,9±3,7	-113,0	1,9	-58,2	63,8
Cu^{2+}	75,2±3,8	-98,7	1,9	-64,4	75,2
Mg^{2+}	68,4±3,4	-138,1	1,3	-466,9	53,8
Ca^{2+}	64,0±3,2	-53,1	1,0	-542,8	68,0
Zn^{2+}	47,1±2,4	-112,1	1,7	-153,9	50,5
Sr^{2+}	69,4±3,5	-32,6	1,0	-545,8	71,9
Cd^{2+}	58,3±2,9	-73,2	1,7	-75,9	59,9
Ba^{2+}	77,7±3,9	9,6	0,9	-537,6	83,1

Al^{3+}	$14,3 \pm 0,7$	-321,7	1,6	-531,0	16,9
La^{3+}	$33,0 \pm 1,6$	-217,6	1,1	-707,1	32,8

Відношення спостережуваних і прогнозованих значень активності лізоциму для навчальної та тестової вибірок, представлені на рис. 3.9.

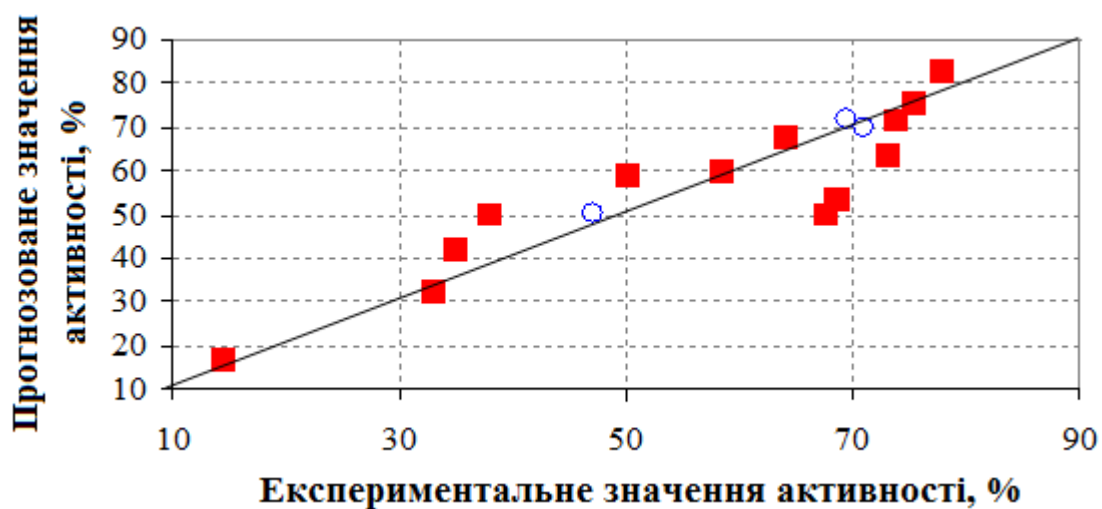


Рис. 3.9. Спостережувані (■) і прогнозовані (○) значення гідролітичної активності лізоциму

На діаграмі (рис. 3.10) наведені відсоткові відношення абсолютних значень нормованих внесків структурних параметрів в досліджувану активність – усі три параметри в рівній мірі впливають на зміну гідролітичної активності.

Виходячи з рівняння, гідролітична активність лізоциму збільшується в присутності іонів металів з високою електронегативністю і їх ентропією в водному розчині і низькою ентальпією в тому ж середовищі.

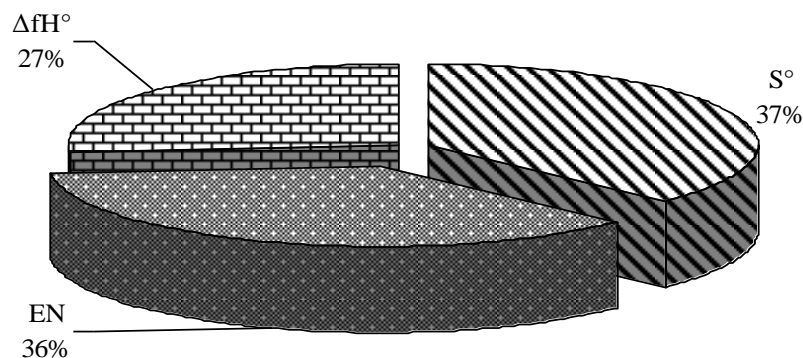


Рис. 3.10. Співвідношення абсолютних величин нормованих внесків структурних дескрипторів в досліджувану властивість

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено інгібуючий вплив хлоридів металів на каталітичну активність лізоциму. З використанням ентropії і ентальпії іонів металів у водному розчині, а також іонізаційної електронегативності, як дескрипторів, вперше отримано QSAR модель, яка адекватно описує вплив іонів металів на активність лізоциму.

3.3 Дослідження синергітичного ефекту лізоциму з протеазами і динатрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти

Раніше в ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України були проведені дослідження з вивчення активності мікробного препарату лізорецифіну, до складу якого входить лізоцим, що продукується *Streptomyces var. Lyticus*, при сумісній іммобілізації з протеазами [180]. Комплексний препарат проявляв збільшену бактеріолітичну активність при додатковому введенні у реакційну суміш протеази С і лужної протеази.

З огляду на вищевикладене, цікаво було дослідити вплив протеаз на можливість підсилення гідролітичної активності лізоциму. Ідея така, що додаткове розщеплення пептидних зв'язків пептидоглікану клітинної стінки

бактерій буде спрощувати доступ лізоциму до β -1,4-глікозидних зв'язків субстрату. Схематично процес зображений на рис. 3.11.

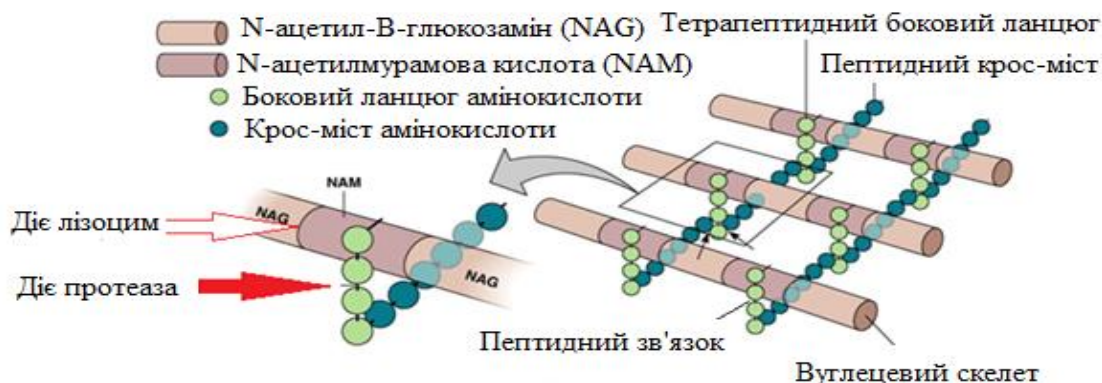


Рис. 3.11. Структура пептидоглікану клітинних стінок бактерій [33]

На рисунку 3.12 представлена гідролітична активність лізоциму в присутності протеази С і лужної протеази. Найбільша активність спостерігається при сумісній дії лізоциму з протеазою С і становить 44000 од/мг, що перевищує активність лізоциму на 100%.

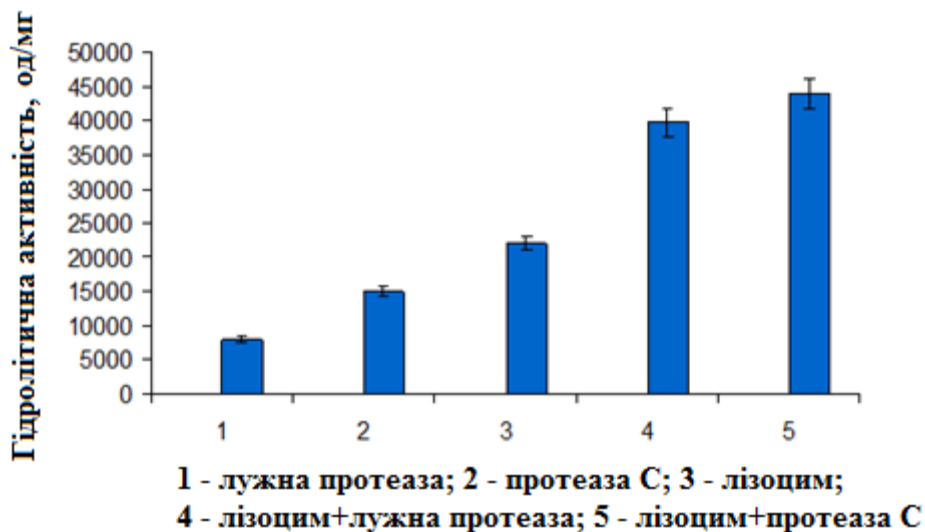


Рис. 3.12. Гідролітична активність лізоциму при його поєднанні з протеолітичними ферментами

При дослідженні масових відношень лізоцим: протеаза показано, що максимальна гідролітична активність спостерігається при відношенні 1:10, як у випадку з протеазою С, так і для лужної протеази (рис. 3.17).

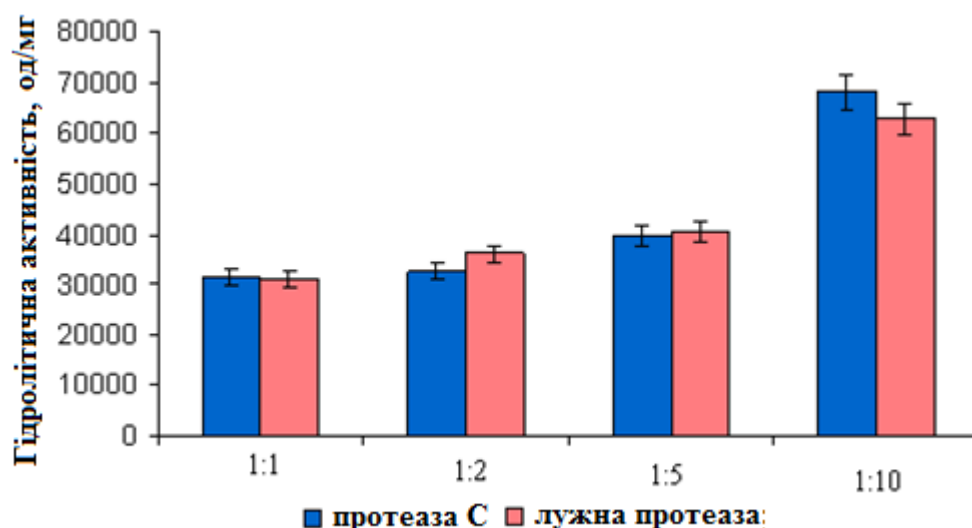


Рис. 3.13. Залежність гідролітичної активності лізоциму від масових відношень лізоцим: протеаза

З даних літератури відомо, що активність лізоциму можна підвищити стосовно грамнегативних бактерій додаванням до реакційної суміші Na_2EDTA [181].

З цією метою було вивчено активність виділеного препарату лізоциму при різних мольних концентраціях Na_2EDTA (рис. 3.18).

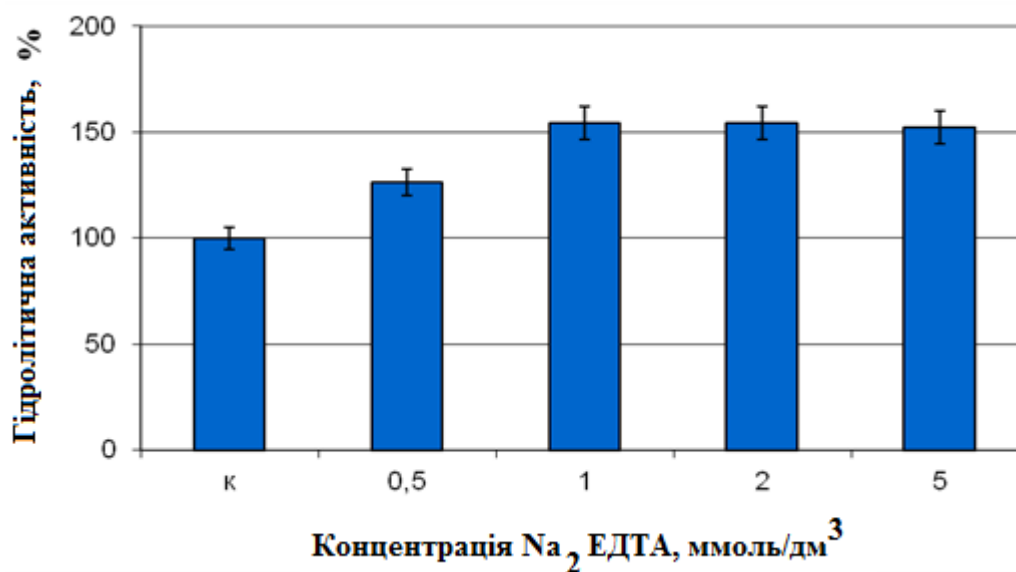


Рис. 3.14. Вплив Na_2EDTA на гідролітичну активність лізоциму

Сумісне використання Na_2EDTA в діапазоні концентрацій 1-5 ммоль/дм³ і лізоциму дозволяє збільшити гідролітичну активність на 54%. Потенціююча дія ЕДТА пояснюється здатністю утворювати хелатні комплекси з двовалентними іонами металів, наприклад, з кальцієм або магнієм, які важливі для підтримки клітинної структури бактерій. Видалення катіонів металів призводить до дестабілізації зовнішнього ліпополісахаридного шару, поверхневих клітинних структур, до зміни їх заряду і полегшує доступність пептидоглікану бактеріальної стінки для лізоциму.

Отримані результати можна використовувати при іммобілізації лізоциму з метою створення високоактивних препаратів антимікробної дії.

Висновки до розділу 3.

Таким чином, в результаті вищеописаних досліджень удосконалено метод В.Я. Мікельсона для виділення лізоциму, що дозволяє отримувати в кристалічному вигляді в лабораторних умовах стабільний активний ензим з білка курячого яйця. Ензим характеризується високим ступенем чистоти, перспективний для використання в біотехнологічних і біомедичних цілях, встановлені фізико-хімічні характеристики виділеного препарату (вміст білка, рівень гідролітичної активності, рН- і термозалежності, рН- і термостабільності гідролітичної активності), які можна порівняти з комерційним препаратом лізоциму AppliChem.

Досліджено вплив іонів лужних, лужноземельних і перехідних металів на гідролітичну активність отриманого ферменту. Методом QSAR аналізу вперше отримано трьохпараметрову модель з використанням електронегативності за Полінгом, ентропії і ентальпії іонів металів (лужних, лужноземельних і перехідних) як дескрипторів, що описує інгібуючий вплив широкого набору хлоридів металів на активність лізоциму.

Запропоновані підходи до збільшення гідролітичної активності лізоциму шляхом додавання протеолітичних ферментів. Показано, що додавання

Na₂ЕДТА (1-5 ммоль/дм³) сприяє підвищенню активності лізоциму на 54,0%; а в присутності протеази С і лужної протеази загальна ферментативна активність суміші вища на 68-100%.

За матеріалами даного розділу опубліковані наступні роботи:

1. Декіна С.С., Овсепян А.М., Артеменко А.Г., Романовська І.І., Кузьмін В.Є. Дослідження впливу іонів металів на активність лізоциму методом QSAR аналізу // Мікробіологія і біотехнологія -2012.- № 4 (20). – С. 44-50.

2. Dekina S.S., Romanovskaya I.I., Ovsepyan A.M., Bodyul M.G., Toptikov V.A. Isolation and purification of lysozyme from the hen egg white // Biotechnologia Acta – 2015. – V.8, No 6. - С. 41 – 47.

3. Декина С.С. Исследование поведения молекул лизоцима при иммобилизации в растворы полимеров // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (9-13 апреля 2012 г., Москва) - С. 1-2.

4. Овсепян А.М., Декина С.С., Чернецкая С.В., Слончак В.С. Выделение и частичная очистка лизоцима из белка куриных яиц // Тез. докл. XVI конференции молодых ученых и студентов-химиков южного региона Украины с международным участием, Одесса, 28 – 30 апреля 2014. – С. 48.

5. Овсепян А.М., Бодюл М.Г., Декина С.С. Виділення і очищення лізоциму з білка курячого яйця // Мат. Конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015», 23-24 квітня. – Київ. –2015. – С. 42.

6. Овсепян А.М., Декина С.С. Разработка метода выделения высокоочищенного лизоцима из белка куриных яиц // XVIII scientific youth conference «Problems and achievements of the modern chemistry», May 17-20. – Odessa, 2016. – P. 71.

РОЗДІЛ 4.

РОЗРОБКА МУКОАДГЕЗИВНИХ ЛІЗОЦИМ-ПОЛІМЕРНИХ СИСТЕМ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ

Для отримання стабільних форм білкових препаратів в біотехнології, в залежності від призначення, застосовують 2 основні підходи: іммобілізація шляхом нековалентного зв'язування і хімічне приєднання безпосередньо до носія або за допомогою лінкера [182, 183].

Для іммобілізації лізоциму в роботі використовували методи включення в гелі полімерів, що меншою мірою порушують білкову структуру ензиму і дозволяють конструювати нові стабільні, високоактивні препарати пролонгованої дії, визначеного вектора всмоктування [184-188]. Слід зазначити, що відсутність іммобілізованих форм лізоциму на фармацевтичному ринку України, особливо для таких областей медицини, як стоматологія і офтальмологія, а також необхідність приготування розчинів *ex tempore* стимулює розвиток досліджень з розробки сучасних мукоадгезивних полімерних форм ензиму в комплексі з біологічно активними речовинами, що дозволяють поліпшити стабільність, біодоступність лізоциму і забезпечити очікуваний пролонгований терапевтичний ефект.

4.1 Дослідження взаємодії лізоциму з розчинами полімерів природного і синтетичного походження

Для іммобілізації БАР з метою їх стабілізації і пролонгування широко використовуються різні полімери природного і синтетичного походження. У кожному конкретному випадку необхідно проведення комплексу досліджень з метою з'ясування наявності можливих взаємодій білкової молекули і полімеру, які можуть призводити до втрати біологічної активності ензиму.

У разі взаємодії ферменту і полімерів в водних розчинах дослідження доцільно проводити з використанням реологічного і оптичних методів. Це

обумовлено багатоточковими і численними нековалентними взаємодіями компонентів, відсутніми в твердому стані.

Серед різних гідродинамічних властивостей розчинів найбільш тісно зв'язаною з формою макромолекули характеристикою, є в'язкість. Відомо, що молекули високомолекулярних сполук в розгорнутому стані надають розчинам більш високу в'язкість, ніж згорнуті в спіраль або клубок. Крім того, розгорнутий стан полімерних ланцюгів забезпечує доступність функціональних груп для взаємодії з такими ферменту. В результаті в'язкість таких полімерних систем часто знижується внаслідок утворення комплексів полімер-білок або полімер-фермент [188].

Спостережувані зміни значень в'язкості розчинів таких полімерів як декстран, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, желатин, гідроксипропілметилцелюлоза при додаванні лізоциму підтверджують зміни конфігурації білкових молекул, що може свідчити про утворення асоціатів білок-полімер (табл. 4.1). Слід зазначити, що ця зміна більшою мірою характерна для природних полімерів, ніж для синтетичних, оскільки структури природних полімерів більш розгалужені, ніж структури, наприклад, полівінілового спирту і полі-N-вінілпіролідону, і мають більшу кількість реакційноздатних функціональних груп.

Таблиця 4.1.

Реологія розчинів полімерів з лізоцимом

Полімер*	Кінематична в'язкість, мм ² /с		
	полімер	полімер+лізоцим	зміна, %
Декстран	1,665	1,055	36,6
ПВС	0,220	0,203	7,70
Na-КМЦ	2,634	3,390	22,30
Желатин	1,250	2,200	45,50
ПВП	4,880	5,700	14,40
ГПМЦ	1,429	1,079	24,50

*концентрації полімерів вибиралися відповідно до параметрів віскозиметра Оствальда, концентрація лізоциму постійна 0,1 %.

Надалі при виборі полімерної матриці для іммобілізації лізоциму враховували наявність змін реологічних характеристик розчину.

Взаємодію декстрану і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з лізоцимом вивчали з використанням УФ-спектрів поглинання і спектрів люмінесценції вільного лізоциму і лізоциму, включеного в розчини полімеру.

У розчині лізоцим-Na-КМЦ відзначалося збільшення оптичної густини розчину з ростом концентрації полімеру (гіперхромний ефект) в результаті утворення білок-полімерного комплексу за рахунок виникаючих електростатичних взаємодій (рис. 4.1).

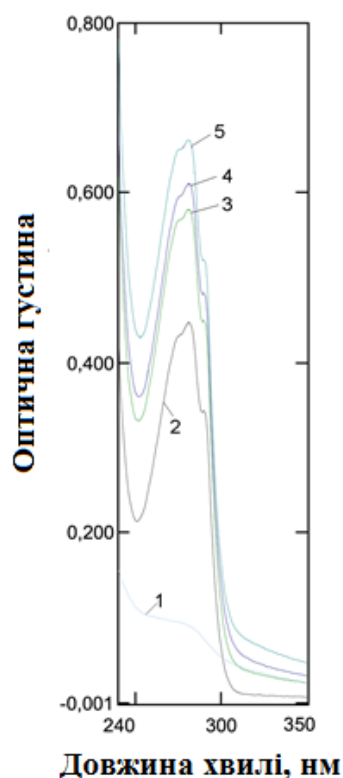


Рис. 4.1. Електронні спектри поглинання водних розчинів вільного і включеного в Na-КМЦ лізоциму: 1 - спектр поглинання 0,25% розчину Na-КМЦ; 2 - 0,02% лізоцим; 3 - лізоцим з додаванням 0,1% Na-КМЦ; 4 - лізоцим з додаванням 0,2% Na-КМЦ; 5 - лізоцим з додаванням 0,25% Na-КМЦ

Дослідження УФ-спектрів поглинання вільного лізоциму і лізоциму, включеного в розчини декстрану, не показало такої значної зміни оптичної густини, як у випадку натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (рис. 4.2).

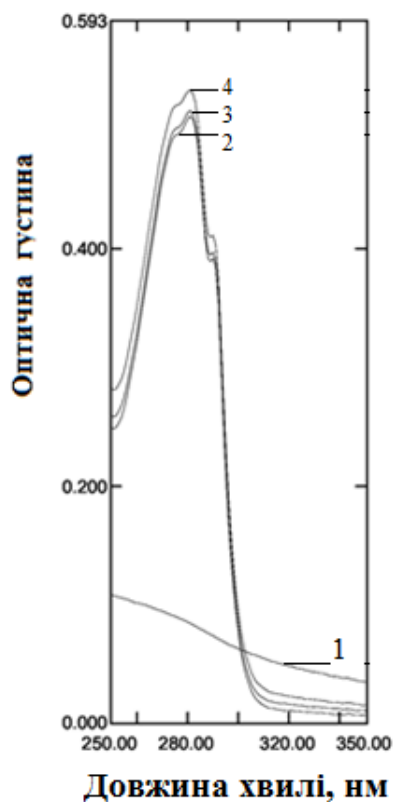


Рис. 4.2. Електронні спектри поглинання водних розчинів вільного лізоциму і включеного в декстран: 1 - спектр поглинання 0,25% розчину декстрану; 2 - 0,02% лізоцим; 3 - лізоцим з додаванням 0,1% декстрану; 4 - лізоцим з додаванням 0,25% декстрану

У наведених на рис. 4.3 спектрах люмінесценції вільного лізоциму і лізоциму, включеного в розчини Na-КМЦ, спостерігається зменшення інтенсивності люмінесценції ($I_{\text{люм.}}$) ензиму при збільшенні концентрації полімеру, що також свідчить про утворення білок-полімерного комплексу.

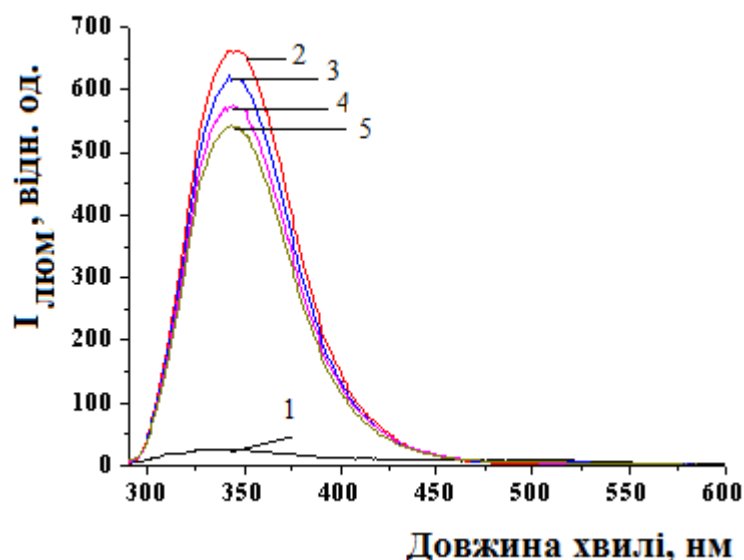


Рис. 4.3. Спектри люмінесценції водних розчинів вільного і включеного в Na-КМЦ лізоциму: 1 - спектр люмінесценції 0,25% розчину Na-КМЦ; 2 - 0,02% лізоциму; 3 - лізоцим з додаванням 0,1% Na-КМЦ; 4 - лізоцим з додаванням 0,2% Na-КМЦ; 5 - лізоцим з додаванням 0,25% Na-КМЦ.

Спектри люмінесценції вільного лізоциму і лізоциму, включеного в розчин декстрану наведені на рис. 4.4. Спостерігається зменшення інтенсивності люмінесценції ензиму при збільшенні концентрації полімеру, що свідчить про взаємодію ензим-полімер (рис. 4.4). В усіх випадках концентрація лізоциму залишалася незмінною.

Слід зазначити, що λ_{\max} в обох випадках при дослідженні як УФ-поглинання (280 нм), так і люмінесценції (350 нм), залишається без змін, тобто конфігураційні зміни незначні і не порушують природну конфігурацію лізоциму.

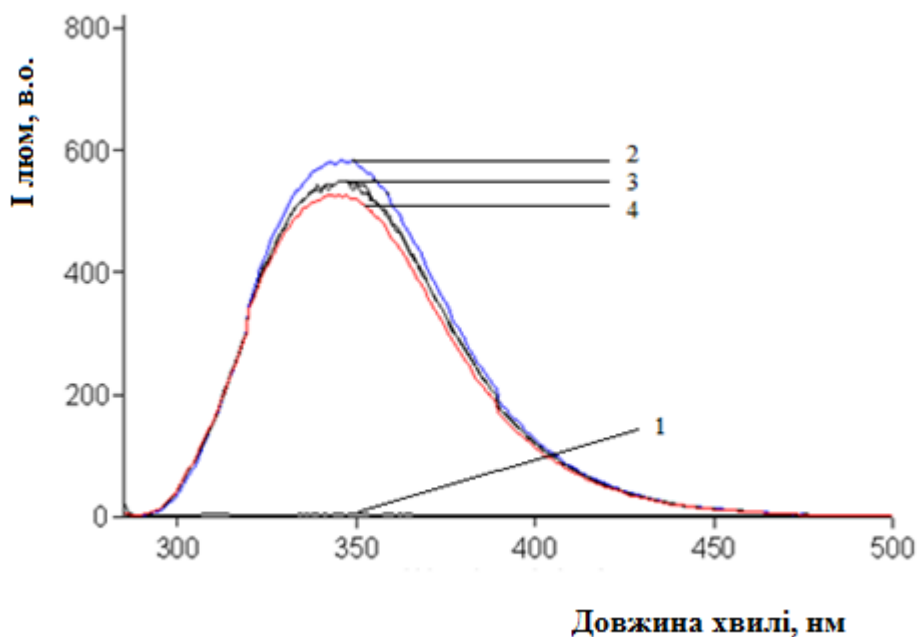


Рис. 4.4. Спектри люмінесценції водних розчинів вільного і включеного в декстран лізоциму: 1 - спектр поглинання 0,25% розчину декстрану; 2 - 0,02% лізоциму; 3 - лізоцим з додаванням 0,1% декстрану; 4 - лізоцим з додаванням 0,25% декстрану

З даних літератури відомо, що у водних розчинах чистий лізоцим утворює олігомерні структури за рахунок нековалентних взаємодій (Ван-дер-Ваальсові, електростатичні, гідрофобні взаємодії, водневі зв'язки та ін.), беручи участь в молекулярних механізмах агрегатоутворення [54, 189].

У зв'язку з цим становило інтерес вивчення впливу полімерів на процеси утворення олігомерних структур лізоцимом мас-спектрометричним методом. Мас-спектрометричні дослідження проводили згідно п. 2.2.7 сумісно з с.н.с., к.х.н. Т.Ю. Громовим в Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України (м. Київ).

Методом МАЛДІ підтверджено наявність асоціатів в комерційному препараті лізоциму в водному розчині, при цьому молекула ферменту представлена як мономером з М.м. 14,225 кДа, так і олігомерними формами - від димеру з М.м. 28,527 кДа до октамеру з М.м. 114,845 кДа (рис. 4.5 а, 4.6 а).

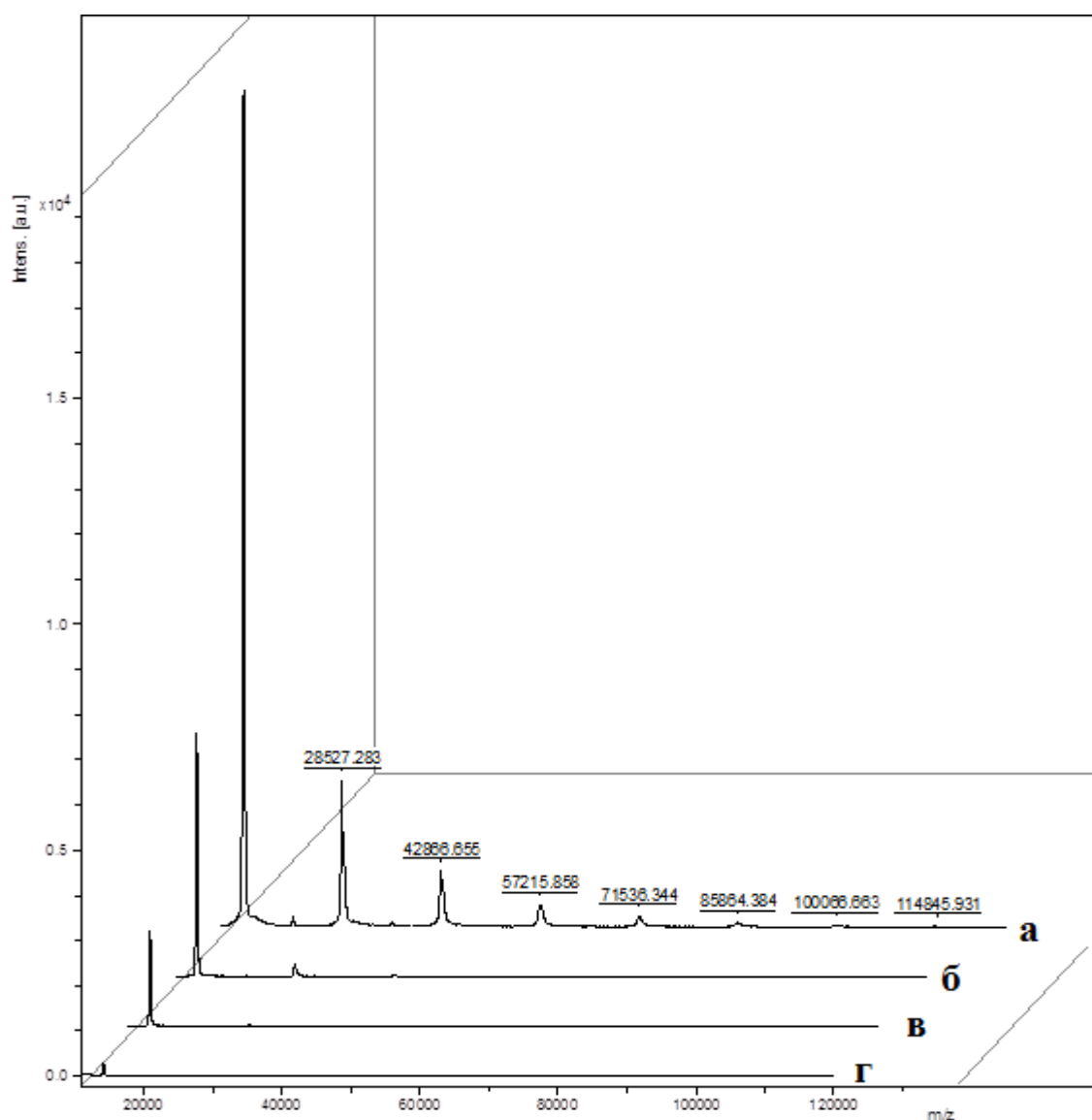


Рис. 4.5. MALDI-спектр лізоциму з желатином: а - лізоцим; б - лізоцим: желатин (1: 50); в - лізоцим: желатин (1: 150); г - лізоцим: желатин (1: 600)

Вперше показано, що в процесі іммобілізації лізоциму в желатин при збільшенні масового відношення фермент: носій спостерігається розпад олігомерних асоціатів на мономери (рис. 4.5 б, в, г), аналогічна ситуація спостерігається і в разі Na-КМЦ (рис. 4.6).

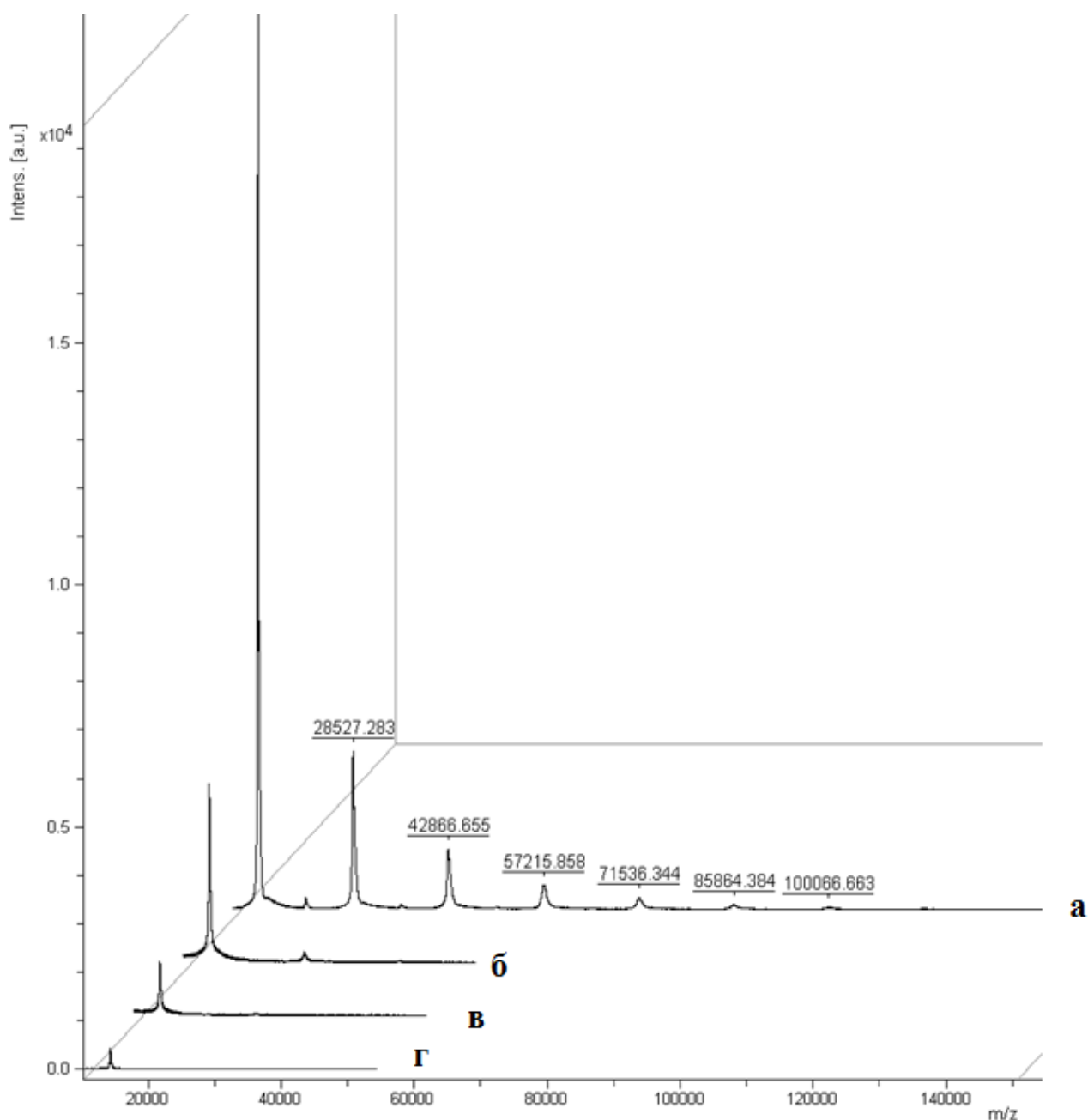


Рис. 4.6. MALDI-спектр лізоциму з Na-KMЦ: а - лізоцим; б - лізоцим: Na-KMЦ (1:50); в - лізоцим: Na-KMЦ (1: 150); г - лізоцим: Na-KMЦ (1: 600)

З даних табл. 4.2 випливає, що збільшення концентрації полімеру в розчині призводить до збільшення відношення інтенсивності піків мономеру лізоциму до димеру і тримеру. При цьому менше число олігомерних структур лізоциму в разі Na-KMЦ можна пояснити більш міцними взаємодіями, ніж з

желатином, що може сприяти збільшенню пролонгування біологічної дії ензиму в подальшій розробці його мукоадгезивних лікарських форм.

Таблиця 4.2.

Відношення інтенсивностей піків структур лізоциму, що утворюються в водних розчинах полімерів

Масові відношення ензим: полімер	Мономер/ Димер	Мономер/ Тример	Мономер/ Тетрамер
Лізоцим	5,6	15,2	41,8
Лізоцим: желатин (1: 50)	17,3	111,6	412,3
Лізоцим: желатин (1: 150)	62,7	-	-
Лізоцим: желатин (1: 600)	-	-	-
Лізоцим: Na-КМЦ (1: 50)	15,8	66,7	-
Лізоцим: Na-КМЦ (1: 150)	17,7	-	-
Лізоцим: Na-КМЦ (1: 600)	47,7	-	-

Таким чином, з використанням комплексу фізико-хімічних методів досліджень показано, що стабілізація лізоциму розчинами полімерів відбувається за рахунок утворення асоціатів і залежить від природи, структури і концентрації полімерних носіїв.

Найміцніші взаємодії лізоцим-полімер за рахунок електростатичних сил спостерігаються для желатину, що має в своєму складі також карбоксильні і аміногрупи, і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (карбоксильні групи).

Вперше описані отримані результати, що зачіпають молекулярні механізми дезагрегації асоціатів лізоциму, індукованої процесом іммобілізації в досліджуваних полімери шляхом комплексоутворення, в подальшому використовували при розробці ефективних мукоадгезивних препаратів ензиму пролонгованої дії, відповідно до поставлених біотехнологічних і медичних завдань.

4.2 Розробка препарату «штучна сльоза» з лізоцимом

Однією з найбільш важливих проблем сучасної офтальмології є синдром «сухого ока», який зустрічається у 9-18% населення розвинених країн світу [190]. Це стан, при якому кількості слізної плівки на рогівці недостатньо, щоб зволожити поверхню ока, в результаті чого можуть виникати зміни, що супроводжуються дискомфортом, а в тяжких випадках - втратою зору. Серед причин захворювання називають безконтрольний прийом антидепресантів і антигістамінних препаратів, використання контактних лінз, косметичних засобів недостатньої якості, тривале перебування в приміщеннях з кондиціонерами, робота за комп'ютером та ін. [191-193]. Одним з основних методів лікування синдрому «сухого ока» є сльозозамінна терапія [192].

Вивчення широкого спектру препаратів, представлених на фармацевтичному ринку України, показало, що штучні замінники сльози відрізняються між собою в'язкістю і хімічним складом, а також випускаються у вигляді очних крапель і гелів [194]. Однак серед великої кількості вживаних препаратів відсутня "штучна сльоза", що містить лізоцим.

Лізоцим є одним з найбільш важливих бактерицидних компонентів слізної рідини. Ензим секретується основними і допоміжними слізними залозами і на його частку припадає від 20 до 30% загального протеїну [195].

Слід відзначити, що біохімічний склад слізної рідини досить багатокomпонентний. У нього входять:

- вода (до 98%);
- імуноглобуліни (А, G, М, Е) - глобулярні білки, які секретуються В-лімфоцитами і беруть участь у формуванні імунної відповіді;
- лактоферин - поліфункціональний білок плазми крові, має антибактеріальну, антивірусну, протиалергічну, імуномодулюючу дії;
- трансферин - транспортний білок плазми крові, виконує захисну функцію;

- адреналін і ацетилхолін (медіатори вегетативної нервової системи);
- ферменти, в тому числі лізоцим;
- ряд продуктів вуглеводного, білкового (до 0,1%) і мінерального обміну тканин [196].

У кожної здорової людини протягом 1 хв оновлюється близько 15% всієї слізної плівки. Встановлено, що за 1 моргальний цикл в середньому у людини витікає від $1,0 \cdot 10^{-3}$ до $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ см}^3$ слізної рідини, а за 1 хв до $3,0 \cdot 10^{-2} \text{ см}^3$ [197].

Як правило, при захворюваннях очей, а також при синдромі «сухого ока», рівень лізоциму в слізній рідині падає. Це відбувається через зниження загального її об'єму. Отже, кількості ензиму для виконання захисної функції недостатньо.

З огляду на вищеописане, розробка препарату для слъозозамінної терапії, наближеного за своїми властивостями до природного прототипу, неможлива без додавання до складу природного антибіотика - лізоциму. У той же час даний ензим при створенні офтальмологічних препаратів використовується обмежено, про що свідчать нечисленні публікації [198-202]; в Україні, як уже згадувалося вище, такі препарати взагалі відсутні.

Другим важливим аспектом розробки препаратів для терапії синдрому «сухого ока» є обов'язкове застосування полімерів, що мають мукоміметичні властивості, завдяки яким вони здатні моделювати муциновий шар передрогівкової слізної плівки.

Їх використання дозволяє не тільки попереджати або заповнювати дефіцит вологи в кон'юнктивальній порожнині, забезпечувати стабільність слізної плівки у хворих з синдромом «сухого ока» [203], але й відкриває перспективи створення цілого ряду нових препаратів на полімерній основі з різним компонентним складом для терапії широкого спектра очних захворювань різної етіології та патогенезу.

4.2.1 Стабілізація лізоциму розчинами полімерів і дослідження його фізико-хімічних і біохімічних властивостей

З огляду на дані літератури, раніше проведені дослідження щодо взаємодії лізоциму з полімерами і патогенетичну доцільність застосування полісахаридних носіїв для отримання препаратів сльозозамінної терапії, ми використовували як такі декстран і гідроксипропілметилцелюлозу (ГПМЦ). Препарат з таким складом полімерів для сльозозамінної терапії випускається РУП «Белмедпрепарати» і називається «Штучна сльоза».

Обрані полімери мають велику кількість вільних функціональних груп і здатні утворювати численні зв'язки з лізоцимом, не порушуючи конфігурацію ферменту і не призводячи до втрати гідролітичної активності, що докладно описано в розділі 3.

Кількість лізоциму для включення в розчини полімерів було вибрано відповідно до його нормального вмісту в сльозі людини ($0,81 \pm 0,31 - 1,68 \pm 0,66$ мг/см³) згідно джерел літератури [195].

Включення ензиму в розчини декстрану і гідроксипропілметилцелюлози проводили відповідно до методики, описаної в п. 2.2.11.

Основні біохімічні та фізико-хімічні характеристики отриманого препарату представлені в таблиці 4.3.

У літературі є дані про характер зв'язування лізоциму з декстраном. Як показано в роботі Van de Weert, Andersen, & Frokjaer [204] молекула ензиму має форму еліпсоїда розміром $4.5 \times 3.0 \times 3.0$ нм з зосередженими на поверхні позитивними зарядами. Декстрану сульфат являє собою біосумісний поліаніон з розгалуженими полісахаридними ланками і негативно зарядженими карбоксильними групами [34, 205]. При цьому вочевидь, що зв'язування відбувається не в активному центрі молекули ензиму, оскільки активність лізоциму повністю зберігається (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

Характеристика очних крапель з лізоцимом

Показник	Результат, $M \pm m^*$
Масове відношення ГПМЦ:декстран	3,9:1
Вміст лізоциму, мг/см^3	$1,00 \pm 0,05$
Гідролітична активність, од/см^3	38200 ± 2000
Органолептичні властивості	Прозорі, безбарвні, без запаху, липкі
pH	7,4
Густина, г/см^3	$0,996 \pm 0,003$
Осмоляльність, мосмоль/дм^3	298 ± 2
Показник заломлення	1,3339

* $n=5$, $P<0.05$

Густина отриманих лізоцимвмісних крапель дорівнює $0,996 \pm 0,003 \text{ г/см}^3$, що відповідає густині слюзи людини (1 г/см^3). Визначена осмоляльність препарату становить $298 \pm 2 \text{ мосмоль/дм}^3$, що також знаходиться в межах норми для слізної рідини ($275\text{-}316 \text{ мосмоль/дм}^3$). Значення показника заломлення розроблених очних крапель 1,3339, згідно вимог для забезпечення ясного зору цей параметр повинен бути близьким до 1,334. Рівень pH 7,4 теж знаходиться у межах, що необхідні для комфортного використання ($7,2\text{-}8,0$) і відповідають вимогам ізогидрії, тобто характеризуються постійністю і стійкістю pH.

Дослідження в'язкості полімерів показало, що в залежності від складу розчину змінюється його кінематична в'язкість (рис. 4.7). Концентрації ГПМЦ і декстрану були обрані згідно тим, що використовуються в очних лікарських краплях.

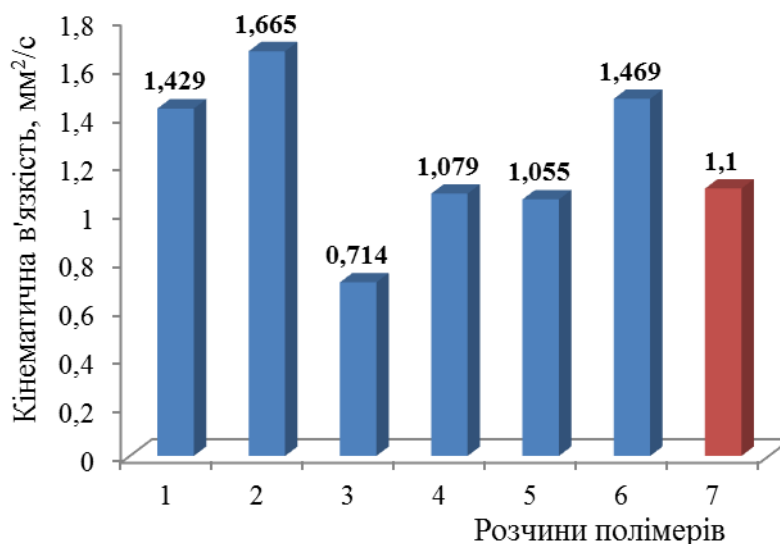


Рис. 4.7. Кінематична в'язкість розчинів полімерів різного складу: 1 - ГПМЦ (0,39%); 2 - декстран (0,1%); 3 - лізоцим (0,1%); 4 - ГПМЦ + лізоцим; 5 - декстран + лізоцим; 6 - ГПМЦ + декстран; 7 - декстран + ГПМЦ + лізоцим

Додавання лізоциму у всіх випадках знижує в'язкість полімерів. Це може бути обумовлено міжмолекулярними взаємодіями компонентів. Для комплексного препарату кінематична в'язкість становить 1,1 мм²/с, що відповідає нормі слізної рідини людини. Така низька в'язкість очних крапель є перевагою, оскільки дозволяє препарату рівномірно розподілятися на поверхні ока і не затуманювати зір.

Дослідження залежності гідролітичної активності стабілізованого полімерами лізоциму від рН інкубаційного середовища наведено на рис. 4.8, показало збереження характерної для ензиму колоколоподібної форми, але існує зсув рН - профілю в область нейтральних значень рН.

Оптимум становить 7,0-7,4, що сприяє більшій ефективності крапель, оскільки рН слюзи людини в нормі знаходиться в діапазоні значень рН $7,11 \pm 0,31$, при синдромі сухого ока - в діапазоні рН 6,75-7,75 [166].

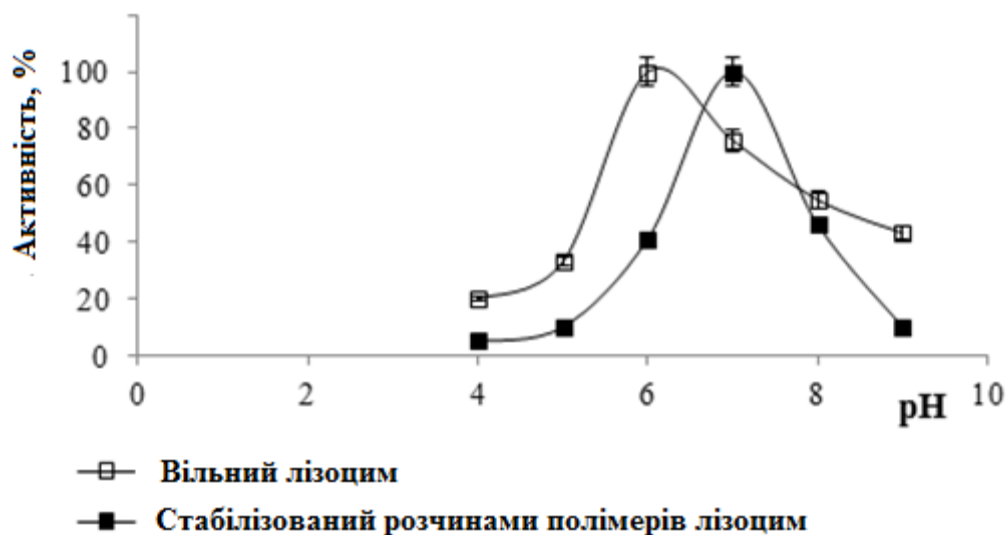


Рис. 4.8. Залежність гідролітичної активності лізоциму від рН інкубаційного середовища

При вивченні впливу температури на активність вільного і стабілізованого полімерами лізоциму показано значне збільшення активності останнього (рис. 4.9). Так, при 37 °С різниця в активності становить 35%.

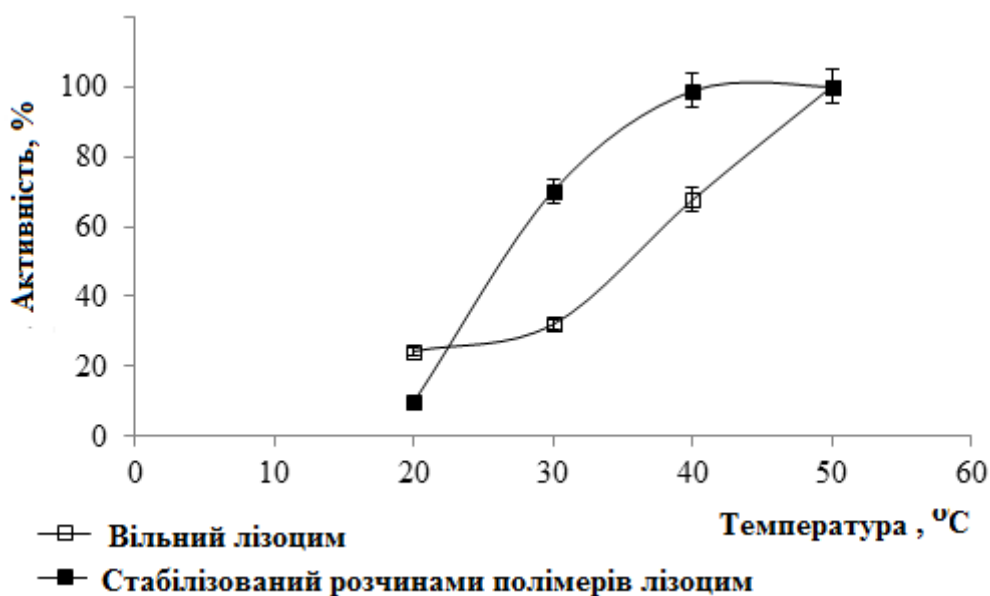


Рис. 4.9. Залежність гідролітичної активності лізоциму від температури інкубаційного середовища

Зміна рН- і термопрофілю гідролітичної активності лізоциму може бути обумовлена взаємодією ензиму з полімерами, появою більш стабільних форм лізоциму і сприятливим мікрооточенням ензиму [23].

Отримані нами результати досліджень строків зберігання препарату свідчать про повну втрату активності лізоциму в водному/буферному розчині протягом перших тижнів, тоді як стабілізований полімерами препарат зберігає гідролітичну активність протягом 1 року зберігання в умовах низьких температур (0-4 ° C) (табл. 4.4).

Таблиця 4.4.

Гідролітична активність лізоциму в процесі зберігання в розчинах

Час зберігання, міс.	Гідролітична активність			
	Лізоцим у водному розчині		Лізоцим, стабілізований полімерами	
	од/мг (M±m)	%	од/мг (M±m)	%
0,2	40000±2100 <i>*P</i> < 0,05	100	40000±2171 <i>*P</i> < 0,05	100
0,5	13600±884 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> < 0,01	34	38200±2130 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> > 0,05	95,5
1	3880±272 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> < 0,01	9,7	38200±2084 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> > 0,05	95,5
2	1520±81 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> < 0,01	3,8	39200±1370 <i>*P</i> < 0,01, <i>**P</i> > 0,05	98
3	0	0	39120±2190 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> > 0,05	97,8
4			39040±1854 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> > 0,05	97,6
5			38800±2211 <i>*P</i> < 0,05, <i>**P</i> > 0,05	97
6			38600±1810 <i>*P</i> < 0,01, <i>**P</i> > 0,05	96,5
7			38720±1664 <i>*P</i> < 0,01, <i>**P</i> > 0,05	96,8
8			38640±1662 <i>*P</i> < 0,01, <i>**P</i> > 0,05	96,6
9			38560±2043	96,4

			$*P < 0,05$, $**P > 0,05$	
10			38600 ± 1845 $*P < 0,05$, $**P > 0,05$	96,5
11			38600 ± 1880 $*P < 0,05$, $**P > 0,05$	96,5
12			38560 ± 1680 $*P < 0,01$, $**P > 0,05$	96,4

* ймовірність відмінностей при $n = 3$; ** відносно вихідної активності вільного лізоциму (40000 од/мг ензиму).

Стерилізація є одним з найважливіших етапів виробництва очних лікарських засобів, що забезпечує повне знищення або видалення з об'єкта всіх життєздатних форм мікроорганізмів. У разі якщо продукція не може бути піддана стерилізації в упакованому вигляді, всі або кілька останніх стадій проводяться в умовах асептичного виробництва [206].

Для стерилізації очних крапель з лізоцимом застосували стерилізуючу фільтрацію. Гідролітична активність після стерилізації становила 89,3% від вихідної. Перевірка розчину після фільтрації показала його мікробіологічну чистоту.

Однак очні краплі, незалежно від умов стерилізації, можуть забруднюватися мікроорганізмами в процесі використання, тому більше 50% очних крапель для лікування синдрому «сухого ока», з метою запобігання росту патогенної мікрофлори після відкриття флакона, виготовляються із додаванням консервантів [207].

Консерванти, що застосовуються в складі очних крапель, не є інертними сполуками і можуть впливати на діючу речовину препарату, тому дослідження їх впливу на гідролітичну активність лізоциму є вкрай важливим. Концентрації консервантів були обрані з урахуванням максимальних доз, що застосовуються в очних краплях.

Результати дослідження представлені в таблиці 4.5

Таблиця 4.5.

Вплив консервантів на гідролітичну активність лізоциму

Консервант	Концентрація, %	Гідролітична активність, % від початкової
Без консерванта (початкова)	0,0	100,0
Бензалконію хлорид	0,01	99,2
Сорбат калію	0,01	97,5
Борна кислота	0,1	98,3
Метилпарабен (ніпагін)	0,1	99,2
Пропілпарабен (ніпазол)	0,05	98,1
Бензиловий спирт	0,5	97,1

Результати досліджень свідчать про те, що розглянуті консерванти не впливають на ферментативну активність лізоциму, тому можуть застосовуватися для створення препарату «штучна сльоза».

Нами був обраний бензалконію хлорид, оскільки він має високу бактерицидну активність і характеризується широким спектром дії стосовно стафілококів, стрептококів, грамнегативних бактерій (кишкової і синьогнійної паличок, клебсієли та ін.), анаеробних бактерій, має протигрибкову, антипротозойну і противірусну дії [207].

Незакупорений флакон крапель з лізоцимом зберігається місяць без втрати активності і зберігаючи мікробіологічну чистоту (відсутній ріст тест-штамів *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). Задля уникнення додаткового введення консервантів можливо пакувати краплі в одноразові тубик-крапельниці, що виготовляються з поліетилену. Загальна схема отримання лізоцимвмісних крапель представлена на рис. 4.10.

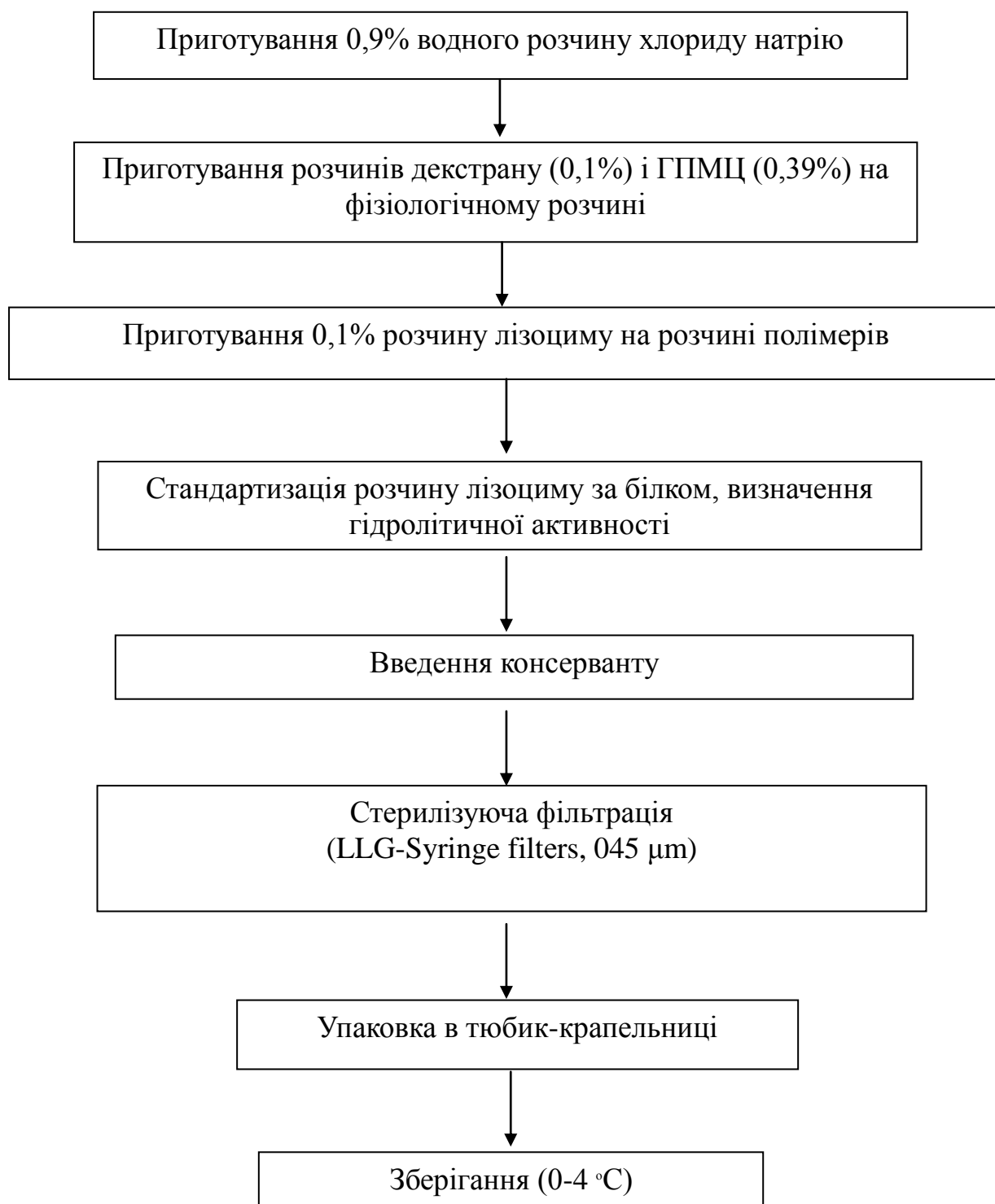


Рис. 4.10. **Схема отримання крапель «штучна сльоза».**

4.2.2. Вивчення офтальмонешкідливості і фармакотерапевтичної ефективності очних крапель «штучна сльоза з лізоцимом» на моделі травматичного кератиту

Дослідження офтальмонешкідливості очних крапель проводилися сумісно з проф., д.м.н. О.П. Сотніковою в ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» за даними кон'юнктивальної проби. Результати експерименту представлені в табл. 4.6.

Таблиця 4.6.

Вивчення офтальмонешкідливості лізоцимвмісних крапель *

Зовнішні структури очі. Симптоми подразнення ока	Алергізуюча дія				
	Початковий рівень	15 хв	1 год	24 год	48 год
1. Слізна протока					
А. Почервоніння слізного каналу	0	0	0	0	0
<i>Оцінка: 0 балів</i>					
2. Склера					
А. Почервоніння склери	0	0	0	0	0
<i>Оцінка: 0 балів</i>					
3. Кон'юнктива					
А. Гіперемія кон'юнктиви повік	0	0	0	0	0
<i>Оцінка: 0 балів</i>					

* Дослідження проводилися відповідно до GLP, методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України на морських свинках (250-300 г), контроль - фіз. розчин.

Через 15 хв після інстиляцій «штучної сльози з лізоцимом» не виявлено почервоніння в області слізної протоки, склери і кон'юнктиви.

При повторному огляді через годину ні в однієї з морських свинок не виявлено гіперемії кон'юнктиви, почервоніння слізної протоки або склери. Після закінчення 24 і 48 годин проба також залишалася негативною, що свідчить про відсутність алергізуючої дії досліджуваного препарату.

Доклінічне вивчення протизапальних та регенераційних властивостей очних крапель «штучна сльоза з лізоцимом» проводили на моделі травматичного кератиту, відтвореного згідно 2.27.

До початку лікування, безпосередньо після скарифікації епітелію рогівки, у всіх кроликів площа деепітелізованої зони рогівки була однаковою і становила в середньому 28,3 мм² (табл. 4.7). У контрольній групі кролів на другий день спостерігалось збільшення площі деепітелізованої зони рогівки на 29,9% за рахунок сильного запалення і набряку. На третій день очевидно зменшення досліджуваної запальної ділянки рогівки на 28,6% в порівнянні з вихідним рівнем, на четвертий день на 59,4%, на п'яту і шосту добу на 95,9% і 97,4% відповідно. Остаточо процес епітелізації рогівки завершився тільки на сьомий день.

У дослідній групі (очні краплі «штучна сльоза з лізоцимом») площа деепітелізованої зони рогівки, починаючи з 2-го дня і протягом усього експерименту активно відновлювалася. Так, на другий день площа ерозії зменшилася і становила 18,3 мм², що на 50,1% менше, ніж у контрольній групі. На третій день площа ерозії зменшилася до 10,2 мм², що на 48,8% менше контрольних значень. На четвертий день вона зменшилася на 58,4% в порівнянні з контролем і становила 4,78 мм². На п'яту добу завершилася повна епітелізація рогівки у всіх тварин цієї групи.

Результати кількісної оцінки інтенсивності запальної реакції в тесті Дрейза наведені в табл. 4.8. Інтенсивність запалення в структурах переднього відділу очей кроликів дослідної групи, які отримували інстиляції очних крапель

«штучна сльоза з лізоцимом», була слабшою, а процес загоєння рогівки протікав швидше.

Таблиця 4.7.

Вплив інстиляцій очних крапель «штучна сльоза з лізоцимом» на процес ранозагоєння рогівки очей кролів

Групи дослідних тварин	Площа деепітелізованої зони рогівки, мм ²						
	Строк спостереження (доба)						
	1 (модель)	2	3	4	5	6	7
Контроль: 0,9 % р-р NaCl n=6	28,3	36,76 ±0,57	19,93±0, 58	11,5±0,3 7	1,14± 0,04	0,73± 0,06	0
Експеримент: Очні краплі «штучна сльоза з лізоцимом» n=6	28,3	18,34 ±0,46 * (50,1)	10,2 ± 0,51* (48,8)	4,78 ± 1,13* (58,4)	0	0	0

n - кількість очей в групі.

* - $P < 0,05$ в порівнянні з контролем.

У дужках наведено фармакологічний ефект, %.

Так, на другий день лікування інтенсивність запалення була знижена на 43,5% (49,7 бали) в порівнянні з показниками контрольної групи (88,0 балів). На третій день запальна реакція в дослідній групі зменшилась на 78,2% (10,7 балів, а в контролі 49,0 балів). На четвертий день запальна реакція в блоці (рогівка + райдужка + кон'юнктива) зменшилася на 79,1% (5 балів), в контролі 24,0 бала. На п'яту добу запальна реакція в дослідній групі повністю зникла, в той час, як в контрольній групі на п'яту і шосту добу інтенсивність запалення поступово зменшувалася (12,0 балів і 7,0 балів відповідно) і зникла на сьомий день експерименту.

Таблиця 4.8.

Вплив інстиляцій очних крапель «штучна сльоза з лізоцимом» на динаміку запального процесу при моделюванні травми рогівки (в балах)

Групи тварин	Структури переднього відділу ока	Строки лікування (доба)						
		1 (модель)	2	3	4	5	6	7
Контроль: 0,9 % р-р NaCl n=6	Рогівка	80,0	80,0	45,0	20,0	10,0	5,0	0
	Райдужка	0	0	0	0	0	0	0
	Кон'юнктива	6,0	8,0	4,0	4,0	2,0	2,0	0
	Сума балів	86,0	88,0	49,0	24,0	12,0	7,0	0
Експеримент: Очні краплі «штучна сльоза лізоцимом» n=6	Рогівка	80,0	45,0	10,0	5,0	0	0	0
	Райдужка	0	0	0	0	0	0	0
	Кон'юнктива	6,0	4,7	0,7	0	0	0	0
	Сума балів	86,0	49,7 (43,5)	10,7 (78,2)	5,0 (79,1)			

n - кількість очей в групі,

У дужках наведено фармакологічний ефект, %.

Таким чином встановлено, що очні краплі «штучна сльоза з лізоцимом» не чинять алергізуючої дії. Інстиляції крапель при лікуванні експериментального травматичного кератиту показали протизапальну і регенераційну дії, сприяючи більш швидкій ліквідації запалення і прискоренню процесу епітелізації в порівнянні з контролем.

Проведені дослідження дозволили отримати препарат лізоциму для сльозозамінної терапії «штучна сльоза», який характеризується повним збереженням гідролітичної активності включеного ензиму (38200 ± 2000 од/см³). Стабілізація ензиму досягається шляхом утворення іонних зв'язків між карбоксильними/гідроксильними групами декстрану і аміногрупами лізоциму, а

мукоадгезивні властивості забезпечуються додаванням гідроксипропілметилцелюлози. Розроблена «штучна сльоза» має близькі до слізної рідини значення в'язкості, густини і осмоляльності і відповідає вимогам, що пред'являються до очних крапель. Лізоцим, стабілізований полімерами, після попередньої стерилізуючої фільтрації зберігається в умовах низьких температур (0-4 ° C) протягом 12 місяців з 96% збереженням вихідної гідролітичної активності. Лізоцимвмісні краплі перспективні для подальших доклінічних досліджень.

4.3 Розробка мукоадгезивного гелю натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з іммобілізованим лізоцимом, лізоцимом і кверцетином

Запальні захворювання слизової оболонки порожнини рота в даний час є однією з найбільш значущих проблем стоматології. Оскільки лізоцим характеризується ефективною протизапальною, імунокоригуючою, бактеріолітичною і адаптаційно-трофічною діями, перспективна розробка його нових полімерних форм для терапії хронічних септичних і гнійних процесів, афтозних стоматитів та інших інфекційних захворювань порожнини рота.

При місцевому застосуванні на слизовій оболонці порожнини рота білкові препарати не завжди ефективні, що пояснюється їх нестабільністю і низькою проникністю слизових для високомолекулярних речовин, рухливостю тканин і слиновиділенням. Використання мукоадгезивних полімерів для створення зручних лікарських форм дозволяє поліпшити біодоступність включеного ензиму або інших біологічно активних речовин внаслідок зростання локальної концентрації і збільшення тривалості контакту з патологічно зміненими тканинами порожнини рота. Широко використовуваною лікарською формою є гелі, що представляють собою структуровані системи, завдяки чому зберігають форму, характеризуються пружністю і еластичністю. Значною перевагою гелю є можливість включати до його складу фізично

несумісні речовини, так як висока в'язкість дисперсійного середовища утримує і забезпечує їх рівномірний розподіл в препараті.

4.3.1 Імобілізація лізоциму і кверцетину в гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і дослідження їх властивостей

Імобілізацію лізоциму, лізоциму і кверцетину в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози здійснювали для отримання мукоадгезивних стоматологічних гелів.

Включення ензиму в гель Na-КМЦ досліджували при різних масових відношеннях фермент: полімер (табл. 4.9).

Таблиця 4.9.

Візуальна оцінка препарату іммобілізованого лізоциму

Масове відношення лізоцим: Na-КМЦ	Характеристика препарату
1:0,4	Лізоцим не включався, гель каламутний
1:2	Лізоцим повністю не включився, каламутний гель
1:4	Лізоцим повністю включився, однорідний прозорий гель
1:6	
1:8	
1:10	

З наведених результатів видно, що іммобілізація лізоциму відбувається при масових відношеннях 1: 4 - 1:10, зменшення кількості Na-КМЦ призводить до неповного включення ензиму, збільшення можливе.

Виходячи з раніше проведених і описаних в п. 4.1 дослідженнях, а також даних літератури [208], слід відзначити, що іммобілізація ензиму відбувається

за рахунок іонних взаємодій великого числа негативно заряджених карбоксильних груп натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з аміногрупами лізоциму.

В результаті хімічної іммобілізації лізоциму в гель Na-КМЦ отримано препарат з кількісним збереженням білка і гідролітичної активності. До складу гелю, перспективного для використання в стоматології, додавали спиртовий екстракт м'яти перцевої для поліпшення органолептичних властивостей, гліцерин - для підвищення еластичності, біглюконат хлоргексидину як консервант.

Основні характеристики продукту представлені в табл. 4.10. Слід зазначити, що обраний метод іммобілізації дозволяє зберегти активність ензиму на вихідному рівні.

Таблиця 4.10.

**Основні характеристики мукоадгезивного гелю
з іммобілізованим лізоцимом**

Показник	Результат визначення
Гідролітична активність, од / мг	68200±3410 (* $P < 0,005$, ** $P > 0,05$)
Вміст лізоциму, мг / г гелю	2,0±0,1 (* $P < 0,001$)
Вміст води, %	95±5,6 (* $P < 0,005$)
pH гелю	7,0±0,1
Органолептичні показники	однорідний, гомогенний, зберігає форму, пружний, пластичний

* - достовірність відмінностей між серіями експериментів для $n = 5$;

** - відносно початкової активності вільного лізоциму (68 000 од/ мг ензиму)

При вивченні залежності виходу лізоциму від часу інкубації в розчині, спостерігається пролонгований кількісний вихід ензиму з мукоадгезивного гелю (рис. 4.11). Максимальна активність іммобілізованого препарату досягається після 180 хв інкубації в умовах, наближених до фізіологічних.

При дослідженні впливу температури на активність гелю з лізоцимом, відзначено звуження термопрофілю активності ферменту в діапазоні 60 - 80 °С (рис. 4.12), що може бути результатом часткової деструкції Na-КМЦ в умовах високих температур і, як наслідок, призводити до часткової дестабілізації білкової молекули.

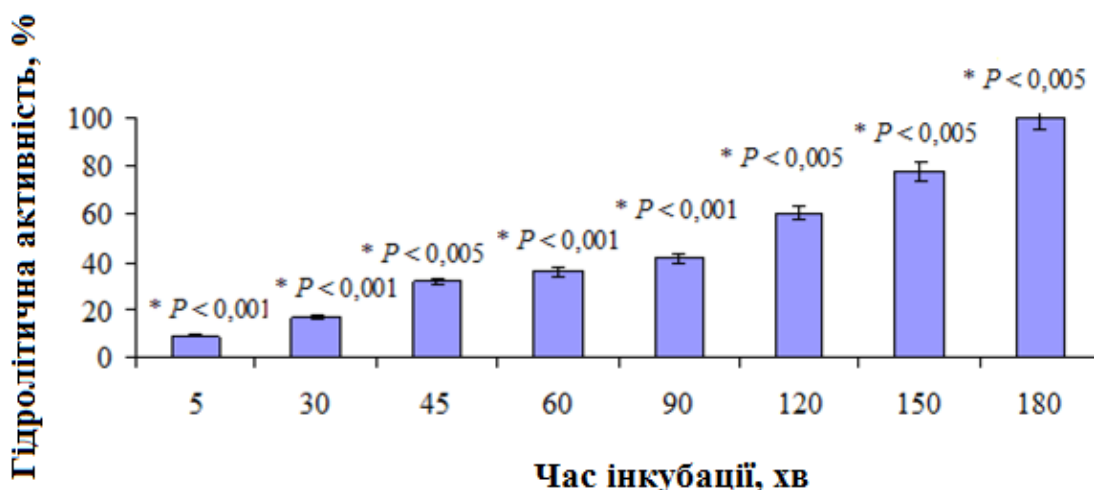


Рис. 4.11. Залежність гідролітичної активності лізоциму, іммобілізованого в гель Na-КМЦ, від часу його інкубації (Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 0,1 моль/дм³; t = 37 °С).

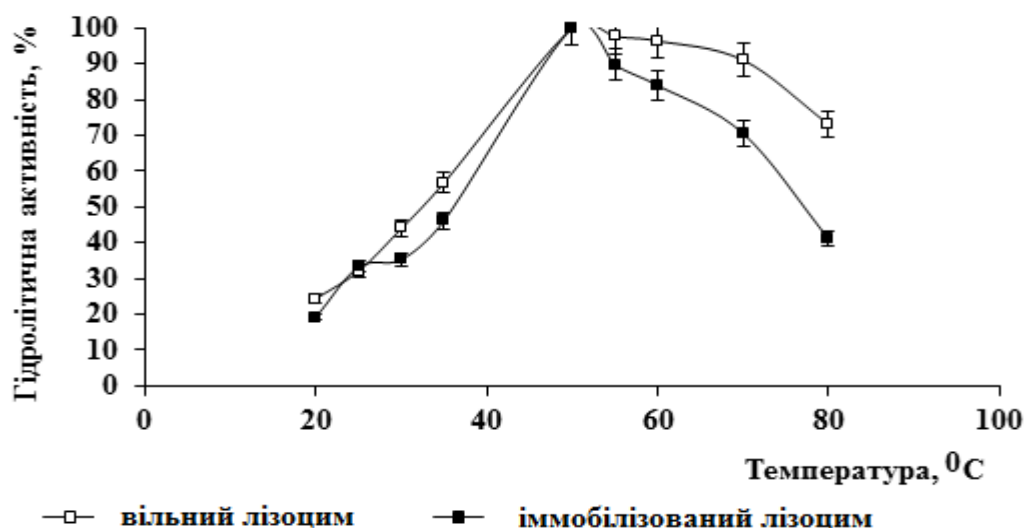


Рис. 4.12. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від температури (Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 0,1 моль/дм³)

pH-Профіль іммобілізованого ферменту, навпаки, розширено в область кислих значень так, при pH 5,5 активність іммобілізованого лізоциму на 42,4% вище, ніж вільного (рис. 4.13).

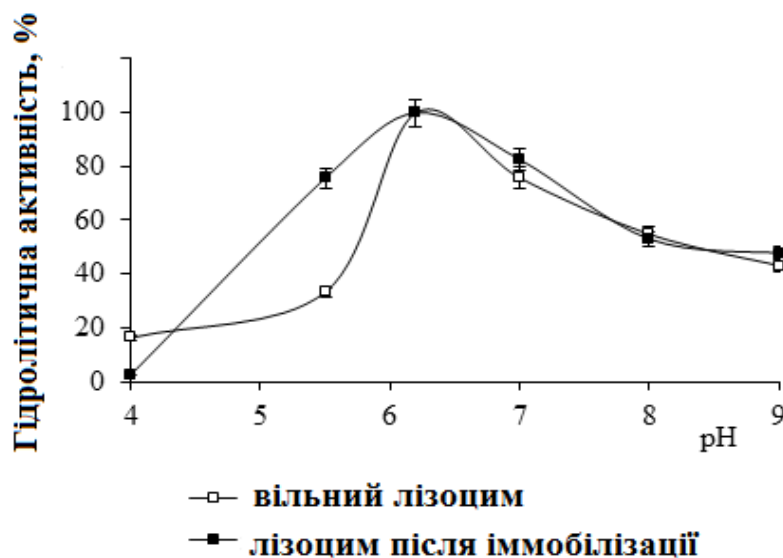


Рис. 4.13. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від pH інкубаційного середовища ($t = 55^{\circ}\text{C}$).

pH-стабільність є одним з найважливіших параметрів, які повинні контролюватися при розробці лікарського препарату антибактеріальної і протизапальної дії [209, 210].

Вільний лізоцим стабільний в фізіологічних умовах при pH 6,0-7,4, однак зниження в область кислих значень призводить до часткової втрати активності.

При різних пошкодженнях шкіри або слизової оболонки спостерігається ацидоз через присутність мікробного обсіменіння, тому обране в роботі значення pH 5,5 - це модельовані умови запалення. В літературі також при розробці медичних препаратів особлива увага приділяється дослідженню стабільності і біологічної активності препаратів при pH 5,5 [211].

Дослідження pH-стабільності гідролітичної активності лізоциму показало, що іммобілізація в Na - КМЦ приводить до підвищення активності в умовах слабокислого середовища і збереження її на високому рівні (95-100%)

протягом 3 год, як при температурі 25 °С, так і при 37 °С (рис. 4.16). Отриманий результат іммобілізації є позитивним, оскільки вільний ензим при рН 5,5 проявляє значно нижчу активність (25-30%) (рис. 4.14).

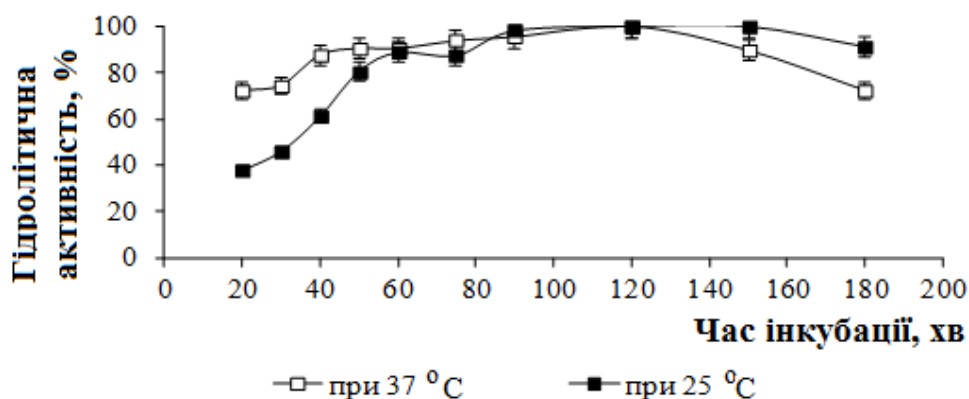


Рис. 4.14. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму від часу інкубації (цитратно-фосфатний буферний розчин, рН 5,5, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Одним з основних показників ефективності іммобілізації є час збереження гідролітичної активності іммобілізованого ензиму. Отриманий препарат протягом 2 років залишався стабільним, істотно не змінюючи активність, значення якої знаходилися на рівні 95 - 100% від вихідної.

Посилення позитивних лікувальних властивостей розробленого гелю з іммобілізованим лізоцимом можливе шляхом додавання природного поліфенолу - кверцетину, що має високу терапевтичну активність, унікальні протизапальну, капіляропротекторну і антиоксидантну дії.

Кверцетин - один з найбільш відомих флавоноїдів, який використовується людиною протягом довгих років, однак погана розчинність у воді, хімічна нестабільність і низька біодоступність кверцетину значно обмежують його застосування [212-215].

Для рівномірного включення кверцетину в гель Na-КМЦ вводили у вигляді 50% спиртового розчину і ретельно перемішували. Вміст кверцетину в гелі

вибирали, виходячи з дозування, що застосовується в медицині [216]. Подальше дослідження масового відношення лізоцим: кверцетин: Na-КМЦ показало, що при обраних умовах (1: 0,4: 6) спостерігається рівномірний розподіл кверцетину, повне включення лізоциму і утворення геля. До складу геля також додавали спиртовий екстракт м'яти перцевої, гліцерин і хлоргексидину біглюконат згідно п. 2.12.

Характеристика отриманого геля представлена в таблиці 4.11. Гідролітична активність препарату 60100 ± 3000 од/мг ензиму, що становить 88% від активності внесеного ензиму (5 мг/г), рН гелю близька до нейтрального значення і становить $6,5 \pm 0,3$. Невелика втрата гідролітичної активності лізоциму після іммобілізації зв'язана з присутністю етанолу в складі композиції. Кверцетин в обраній кількості (2 мг / г гелю) перебуває у вигляді аморфної твердої дисперсії в гелі.

Таблиця 4.11.

**Характеристика мукоадгезивного гелю
з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином**

Показник	Од. вимірювання	Результат визначення*
Гідролітична активність після іммобілізації	од/мг	60100 ± 3000 (* $P < 0,005$, ** $P > 0,05$)
Вміст ензиму	мг/г препарату	$5 \pm 0,3$ (* $P < 0,001$)
Вміст кверцетину	мг/г препарату	$2 \pm 0,1$ (* $P < 0,005$)
Вміст води	%	$95 \pm 5,6$ (* $P < 0,005$)
Органолептичні характеристики	—	однорідний гель жовто-зеленого кольору з м'ятним запахом
рН гелю	—	$6,5 \pm 0,3$

* - достовірність відмінностей між серіями експериментів для $n = 5$;

** - відносно початкової активності вільного лізоциму (68 000 од/ мг ензиму)

Показано пролонгований повний вихід ферменту з отриманого гелю (рис. 4.15) після 180 хв інкубації в умовах, наближених до фізіологічних. На фоні збереження динаміки виходу лізоциму кверцетин вивільняється за більш короткий час (75 хв). Отримані результати динаміки виходу узгоджуються з наведеними в літературі даними як про механічне включення кверцетину в сітку водорозчинного полімеру, так і про наявність водневих взаємодій флавоноїд-полімер [217].

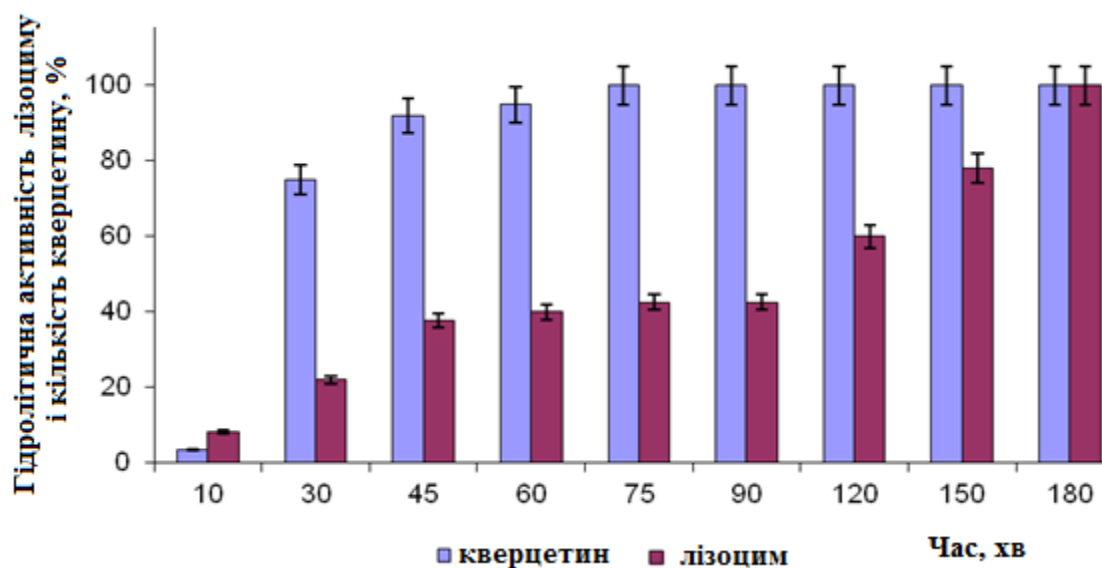


Рис. 4.15. Залежність вивільнення лізоциму і кверцетину з гелю Na-КМЦ від часу інкубації (Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 0,1 моль/дм³)

Основні фізико-хімічні характеристики іммобілізованого сумісно з кверцетином лізоциму (рН, термопрофіль активності, рН, термостабільність) не відрізняються від таких для гелю без кверцетину.

У розробленому гелі протягом року зберігалася ферментативна активність лізоциму і вміст кверцетину не змінювався, що представлено в табл. 4.12.

Таблиця 4.12.

**Гідролітична активність лізоциму і кількість кверцетину в
мукоадгезивному гелі в процесі його зберігання**

Час зберігання	Активність лізоциму		Вміст кверцетину	
	од/мг ($M \pm m$)	%	мг/г ($M \pm m$)	%
Після імобілізації	60010 \pm 3005	100 \pm 5,0	2,0 \pm 0,1	100 \pm 5,0
1 міс	59800 \pm 2990	99,5 \pm 4,9	1,99 \pm 0,1	99,5 \pm 4,9
2 міс	59680 \pm 2984	99,3 \pm 4,9	1,97 \pm 0,1	98,5 \pm 4,9
3 міс	59680 \pm 2984	99,3 \pm 4,9	1,96 \pm 0,04	98,0 \pm 4,9
4 міс	59680 \pm 2984	99,3 \pm 4,9	1,95 \pm 0,05	97,5 \pm 4,9
10 міс	56855 \pm 2842	94,6 \pm 4,7	1,92 \pm 0,11	96 \pm 4,8,
12 міс	54871 \pm 2742	91,3 \pm 4,5	1,91 \pm 0,1	95,5 \pm 4,8

Примітка: $n=5$, $P<0,05$

Таким чином, розроблено ефективний метод імобілізації лізоциму, лізоциму і кверцетину шляхом включення БАР в гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози, показана стабілізація ізбереження основних характеристик ензиму, тому перспективне проведення подальших біологічних досліджень препарату.

4.3.2 Дослідження мукоадгезії гелю з імобілізованим лізоцимом

Однією з найважливіших характеристик полімерних мукоадгезивних форм лікарських препаратів є визначення їх адгезії до слизових оболонок. Виділяють дві основні групи методів: *in vitro* та *in vivo* [218]. У разі роботи в умовах *in vitro* можна використовувати безпосередньо муцин або слизову, в іншому випадку адгезія аналізується в межах живого організму.

Для оцінки мукоадгезії в роботі ми використовували слизову оболонку тонкого кишківника свині, як найбільш близьку за складом і анатомією до такої людини. Експерименти проводили протягом 60 хв, щоб уникнути втрат і зміни характеристик біооб'єкту.

Схема визначення адгезії *in vitro* наведена на рис. 4.16 [219].

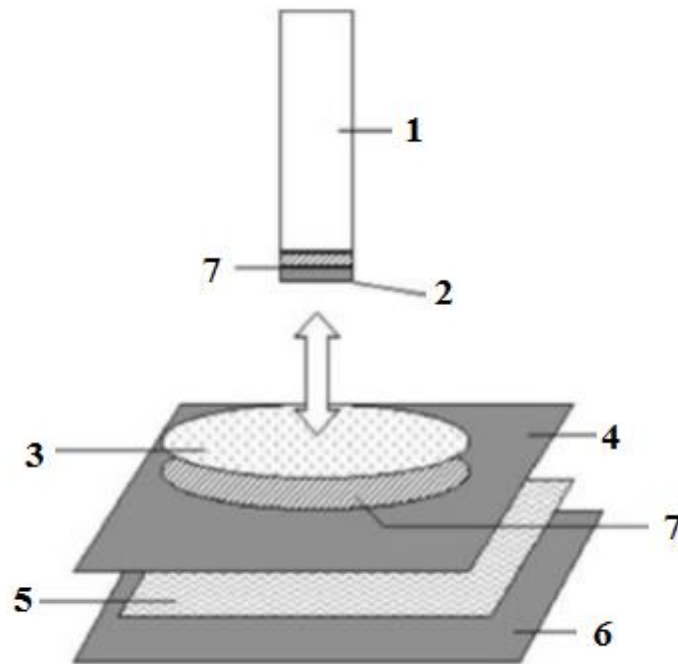


Рис. 4.16. Схема експерименту для визначення мукоадгезії: 1 - циліндр; 2 - мукоадгезивний препарат; 3 - слизова оболонка тонкого кишківника свині; 4 - плівка; 5 - клейка стрічка; 6 - скло; 7 - клей.

За нормальних умов для мукоадгезивного гелю прискорення вільного падіння $g = 9,81$ (кг·с = кг)

$$A = \frac{m}{S \cdot 1000} = 27,1 \frac{27,1}{4,5216 \cdot 1000} \approx 6000 \quad \text{ПА}$$

где A – адгезія до слизової оболонки;

m – маса противаги, г;

S – площа поверхні, см²;

1000 – перерахунок г в кг.

На рис. 4.17 наведені значення сили адгезії різних полімерів до слизової, отримані в незалежному експерименті даним методом.

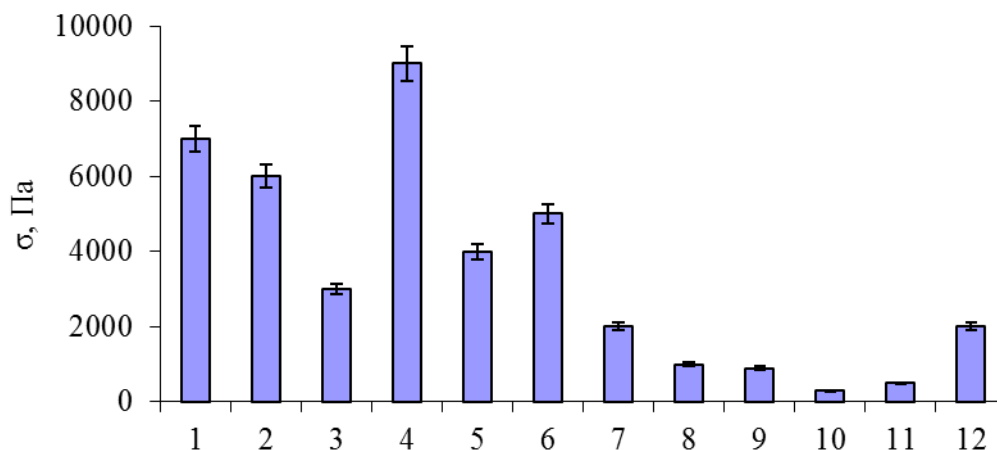


Рис. 4.17. Мукоадгезивні властивості полімерів [219].

Умовні позначення:

- | | |
|---------------------------|----------------------------------|
| 1 – хітозан; | 7 – ацетат хітозану 230; |
| 2 – альгінат натрію; | 8 - гідроксипропілметилцелюлоза; |
| 3 – розчинний біополімер; | 9 – гідроксипропілцелюлоза; |
| 4 – карбопол; | 10 – етилцеллюлоза; |
| 5 – цитрат хітозану; | 11 – коллікоут; |
| 6 – ацетат хітозану 460; | 12 – сукцинат хітозану. |

Сила адгезії розробленого гелю на основі Na-КМЦ дорівнює 6000 Па щодо слизової, тоді як для найбільш використовуваних мукоадгезивних полімерів вона знаходиться в межах 2000 - 9000 Па, це свідчить про високі мукоадгезивні властивості отриманого препарату.

Слід зазначити також, що гель легко і тонким шаром розподіляється по поверхні слизової, а гліцерин в складі препарату запобігає його швидкому висиханню при контакті з повітрям і може сприяти стабілізації активності ензиму.

4.3.3 Експериментальна оцінка лікувально-профілактичної дії гелів з лізоцимом, лізоцимом і кверцетином

Біологічні експерименти проводилися сумісно з чл.-кор. УААН, д.б.н., проф. А.П. Левицьким в ДУ «Інститут стоматології і щелепно-лицевої хірургії НАМН України».

Оцінювали ефективність терапевтичної дії гелю з лізоцимом і кверцетином при запаленні слизової оболонки порожнини рота щурів в індометациновому тесті. Методика моделювання гінгівіту докладно описана в п. 2.27. У таблиці 4.13 представлені результати визначення біохімічних маркерів в яснах щурів в умовах експериментального гінгівіту і вплив іммобілізованого лізоциму і кверцетину на їх рівень.

З цих даних видно, що у щурів з гінгівітом достовірно збільшується рівень МДА, еластази і уреазі, проте знижується рівень лізоциму і каталази. Використання гелю *per os* з лізоцимом і кверцетином нормалізує вищезазначені показники.

Таблиця 4.13.

Вплив аплікацій мукоадгезивних гелів на біохімічні показники ясен щурів з гінгівітом

№	Група	МДА, ммоль/кг	Еластаза, мк- кат/кг	Уреаза, мккат/кг	Лізоцим, од/кг	Каталаза, мкат/кг
1	Контроль	10,8±0,3	40,0±2,0	2,03±0,31	364±67	5,75±0,28
2	Гінгівіт	15,5±0,8 p<0,01	54,2±5,1 p<0,05	3,83±0,25 p<0,01	220±31 p<0,05	4,87±0,19 p<0,01
3	Гінгівіт + лізоцим 5 мг/см ³	12,1±0,6 p>0,05 p ₁ <0,05	41,0±4,0 p>0,5 p ₁ <0,05	2,28±0,46 p>0,3 p ₁ <0,05	312±52 p>0,3 p ₁ >0,05	5,14±0,26 p>0,05 p ₁ >0,3
4	Гінгівіт + кверцетин 2 мг/ см ³	11,5±0,6 p>0,1 p ₁ <0,01	47,6±3,9 p>0,05 p ₁ >0,05	2,91±0,30 p>0,05 p ₁ <0,05	279±38 p>0,05 p ₁ >0,05	5,49±0,27 p>0,3 p ₁ >0,05
5	Гінгівіт + лізоцим (5 мг/ см ³) + кверцетин (2 мг/ см ³)	10,1±0,5 p>0,05 p ₁ <0,01	40,8±4,0 p>0,5 p ₁ <0,05	2,12±0,32 p>0,5 p ₁ <0,01	356±52 p>0,5 p ₁ <0,05	5,68±0,28 p>0,5 p ₁ <0,05

Примітка: p - по відношенню до гр. 1; $p1$ - по відношенню до гр. 2; $M \pm m$, у всіх групах $n = 7$

На рис. 4.18 представлені дані ступеня дисбіозу і антиоксидантно - прооксидантного індексу (АПІ) в яснах щурів з гінгівітом і дисбіозом.

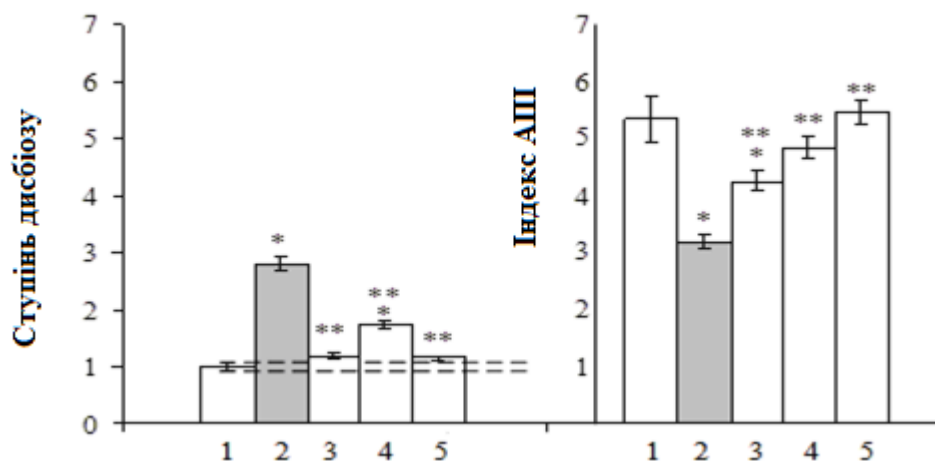


Рис. 4.18. Вплив мукоадгезивного гелю з лізоцимом на ступінь дисбіозу і антиоксидантно-прооксидантного індексу в тканині ясен щурів з експериментальним гінгівітом: 1-контроль, 2-гінгівіт, 3-гінгівіт + гель з лізоцимом (5 мг/см³), 4-гінгівіт + гель з кверцетином (2 мг/см³), 5-гінгівіт + гель з лізоцимом (5 мг/см³) і кверцетином (2 мг/см³).

* - $p < 0,05$ в порівнянні з групою 1, ** - $p < 0,05$ в порівнянні з групою 2

Очевидно, що при патології в яснах збільшується в 2,8 рази ступінь дисбіозу і знижується в 1,7 рази індекс АПІ. Гель з лізоцимом і кверцетином нормалізує обидва показники.

Таким чином, з використанням натрієвої солі карбоксиметилцелюлози як матриці здійснена іммобілізація лізоциму і лізоциму з кверцетином шляхом включення в гель. Показано, що при масових відношеннях лізоцим: кверцетин: полімер (1: 0,4: 6) спостерігається повне включення лізоциму і кверцетину,

збереження гідролітичної активності ферменту. Отриманий гель характеризується високими адгезійними властивостями до слизової, пролонгованою дією. Імобілізований лізоцим активний в широкому діапазоні значень рН, стабільний в кислому середовищі і при зберіганні. Отриманий мукоадгезивний гель з імобілізованим лізоцимом і кверцетином є препаратом з комплексною біологічною активністю і перспективний для проведення подальших біомедичних досліджень.

4.4 Включення лізоциму в ліпофільну мазеву основу

Очні лікарські форми займають особливе місце серед широкого асортименту препаратів, що застосовуються в практичній офтальмології. Захворюваність населення України очною патологією, за статистичними даними, становить 56% у великих містах і близько 49% в сільській місцевості [220]. Провідне місце серед них займають запальні інфекційні ураження очей, збудниками яких є багато мікроорганізмів і деякі віруси. При цьому очні лікарські препарати у вигляді мазей або гелів відрізняються пролонгованим терапевтичним ефектом, високою біодоступністю, досить простою технологією виготовлення, безпечністю і простотою застосування; вони широко затребувані на фармацевтичному ринку.

Для приготування очних мазей застосовується ліпофільна основа, що складається з ланоліну безводного і вазеліну [144]. У даній основі ланолін сприяє фіксації мазі на слизовій і більш повному всмоктуванню лікарських речовин, а вазелін має достатню стійкість до впливу зовнішнього середовища, індиферентність по відношенню до багатьох лікарських речовин, відсутністю подразнюючої дії [221-223].

Для дослідження були виготовлені 35 флаконів, кожен з яких містив 5 г 0,25% мазі лізоциму, що відповідає концентрації ензиму, який використовується в офтальмології. У зразках визначали вміст ферменту, білка в

препараті на момент виготовлення і в процесі зберігання. Фізико-хімічні властивості мазі представлені в табл. 4.14.

Таблиця 4.1.

Фізико-хімічні властивості мазі з лізоцимом

Властивість	Характеристика
Відповідно до класифікації Область використання	Мазь для нанесення на слизову оболонку. Очні мазі.
За складом За характером дії на організм За типом дисперсності За типом мазевої основи	Складна. Місцева. Гетерогенна комбінована. Гідрофобна. Вуглеводна.
Колір	Кремовий
Маса, г	5
Гідролітична активність*, од	20000 ± 1500
pH-оптимум дії	6,0-6,5
Термооптимум	55 °C
Вміст білка	55 %
Активність при 37 °C	75 % від вих.

*Na-фосфатний буферний розчин pH 6,2, 55 °C

Швидкість і повнота вивільнення лізоциму з мазі представлені на рис. 4.19. Максимальний вихід ензиму спостерігається через 5 год інкубування і становить $50,2 \pm 1,3\%$. Подальша витримка мазі протягом доби не призводить до повного вивільнення білка або збільшення гідролітичної активності, що, очевидно, зв'язано зі здатністю ланоліну до емульгування і інгібуючим впливом мазевої основи.

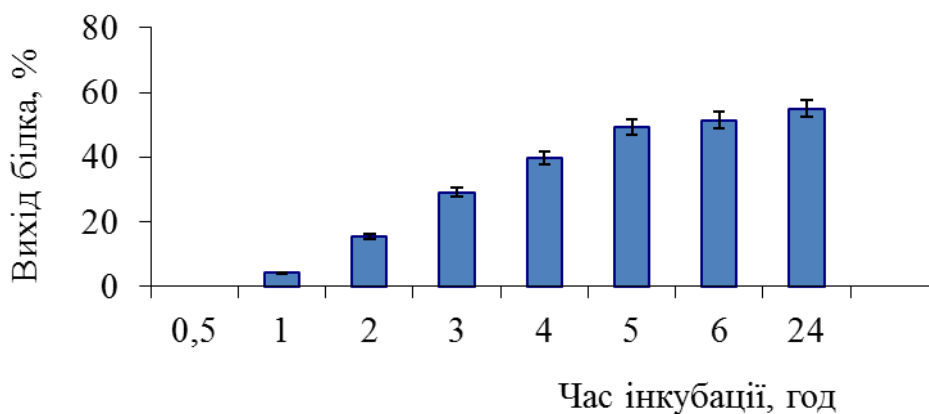


Рис. 4.19. Динаміка вивільнення лізоциму з ланоліно-вазелінової мазевої основи.

При встановленні строку придатності досліджуваного препарату показано збереження гідролітичної активності ферменту і фізико-хімічних характеристик очної форми протягом 3 років зберігання (табл. 4.15).

Таблиця 4.1.

Гідролітична активність мазі з лізоцимом в процесі зберігання

Время хранения, мес.	Гідролітична активність*	
	од/мг	%
Після включення	20773±1038	100,0
1	20770±1039	99,98
3	20673±1034	99,52
6	19215±961	92,50
12	20038±1002	96,46
36	20138±1052	96,94

*Гідролітична активність лізоциму при рН 6,2, 55 °С

Вивчення офтальмонешкідливості очної мазі з лізоцимом (0,25%) проводилося з метою встановлення наявності, характеру і ступеня вираженості можливого токсичного впливу її на зовнішні структури ока. На всіх етапах

експерименту і після закінчення шестигодинного застосування мазі у кроликів дослідної групи стан рогівки і райдужної оболонки перебували на вихідному фізіологічному рівні. Мазева основа (контроль) не викликала симптомів роздратування з боку кон'юнктиви повік кроликів.

Аналіз результатів місцевої реакції на застосування препарату (дослідна група) показав, що у жодного з кроликів в блоці «рогівка + райдужка + кон'юнктива» сумарна оцінка не перевищує 6 балів. Таким чином, тест Дрейза є негативним і мазь лізоциму не має місцево-подразнюючої дії.

За результатами кон'юнктивальної проби у морських свинок (одноразове нанесення мазі лізоциму на праве око) при зовнішньому огляді стан обох очей відповідав фізіологічній нормі. Через 15 хв і через 24-48 год не виявлено будь-яких видимих змін кон'юнктиви очного яблука і склери, що дозволяє оцінювати кон'юнктивальну пробу як негативну і свідчить про відсутність алергізуючої дії очної мазі.

Таким чином, лізоцим, включений в ліпофільну мазеву ланолін-вазелінову основу зберігає гідролітичну активність на рівні 50% після включення і протягом 3 років зберігання. Біологічні експерименти показали офтальмонешкідливість препарату і відсутність місцевоподразнюючої, алергізуючої дії.

4.5 Кріоімобілізація лізоциму в полівініловий спирт

Існуючий прогрес у медичній біотехнології ензимів багато в чому став можливий завдяки використанню нових полімерних носіїв (сорбенти, гранули, плівки, мембрани та ін.), що мають можливість взаємодіяти з біомолекулами, не порушуючи структури, не призводячи до денатурації і при відсутності цитотоксичності [224].

Макропористі носії, наприклад, кріогель полівінілового спирту, частіше використовуються в біотехнології для іммобілізації клітин, оскільки

характеризуються достатньою для них ємністю і розміром пор. Однак ці кріогелі є придатними носіями і для іммобілізації ензимів, вони економічні, нетоксичні, нерозчинні в фізіологічних умовах, утворюють прозорі плівки, що дає можливість застосовувати їх в репаративній медицині [225-229].

Кріогель утворюється з водного розчину полівінілового спирту (ПВС) в процесі заморожування - розморожування внаслідок чисельних водневих зв'язків.

ПВС є стереорегулярним полімером з синдіотактичними та ізотактичними ділянками. Синдіотактичні ділянки відповідальні за формування міжмолекулярних водневих зв'язків, а ізотактичні утворюють внутрішньо-молекулярні зв'язки.

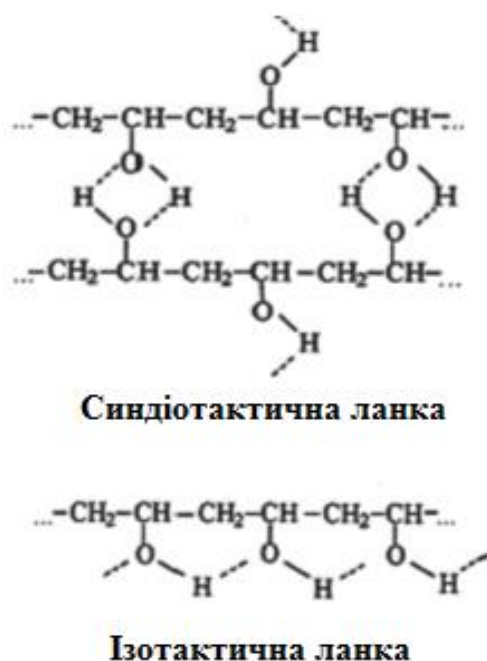


Рис. 4.20. Структура кріогелю полівінілового спирту

4.5.1 Іммобілізація лізоциму в кріогель полівінілового спирту та дослідження його властивостей

Для іммобілізації лізоциму були виготовлені 10% розчини ПВС різної молекулярної маси: 30, 60, 120 кДа. Полівініловий спирт молекулярної маси 30 кДа після двох циклів заморожування-розморожування кріогель не утворював. При використанні ПВС з молекулярною масою 60 кДа отримували неоднорідні плівки з грудочками, механічно неміцні, тоді як полімер з молекулярною масою 120 кДа давав однорідний, прозорий, пружний кріогель. Виходячи з отриманих результатів і даних літератури [229] для кріоіммобілізації лізоциму був обраний ПВС з молекулярною масою 120 кДа, здатний утворювати множинні водневі зв'язку, що призводять до формування кріогелю.

Кріоіммобілізацію ензиму здійснювали відповідно до методики, описаної в п. 2.2.14. В результаті отримані пружні гідрогелеві полімерні покриття пролонгованої дії з високою гідролітичною активністю, основні характеристики яких представлені в табл. 4.14.

Таблиця 4.14.

Характеристика кріогеля з лізоцимом

Властивість	Показник (при n=5)
Мольне відношення лізоцим: ПВС	1: 35
Гідролітична активність, од в плівці	8125 ± 340 (*P<0,05)
Ступінь включення протеїну, %	97 ± 2,5 (*P<0,05)
Площа, см ²	0,8 ± 0,04 (*P<0,05)
Товщина, мм	3,0 ± 0,1 (*P<0,01)
Середня маса плівки, мг	8 ± 0,3 (*P<0,01)
Вміст води, %	93 ± 3 (*P<0,01)
Мукоадгезія, Па	1500
Колір	Безбарвні, прозорі
Час розчинення у воді, фіз. розчині, хв	нерозчинні
Час зберігання, міс	3 міс (94 ± 2,3 % *P<0,01) збереження активності

Показано, що максимальний вихід лізоциму з кріогелю спостерігається через 1 годину інкубації в Na-фосфатному буферному розчині, рН 6,2, 0,1 моль/дм³ при температурі 37 °С (рис. 4.21). При цьому вивільнення ензиму відбувається рівномірно - 50% за перші 30 хв, 50% в наступні 30 хв, це можна пояснити пористою морфологією кріогелю, що забезпечує дифузійно-неутруднене вивільнення лізоциму в зовнішнє середовище.

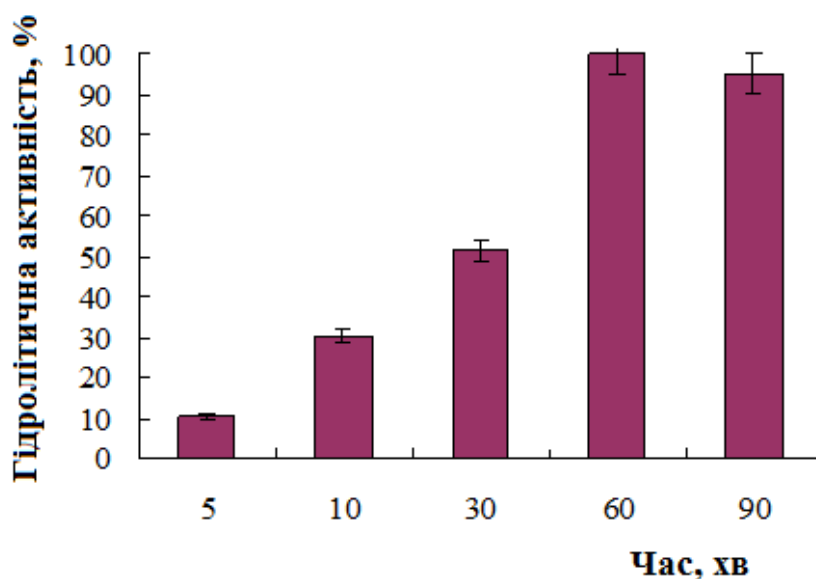


Рис. 4.21. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму від часу інкубації в Na-фосфатному буферному розчині, рН 6,2, 0,1 моль / дм³ при температурі 37 °С

Пористу структуру кріогелю з іммобілізованим лізоцимом підтверджують результати, отримані методом скануючої електронної мікроскопії. На рис. 4.22a просвічують пори кріогелю сферичної форми, розміром до 20 мкм, які видно і на рис. 4.22b, однак на зрізі кріогелю така пористість відсутня при даному способі пробопідготовки.

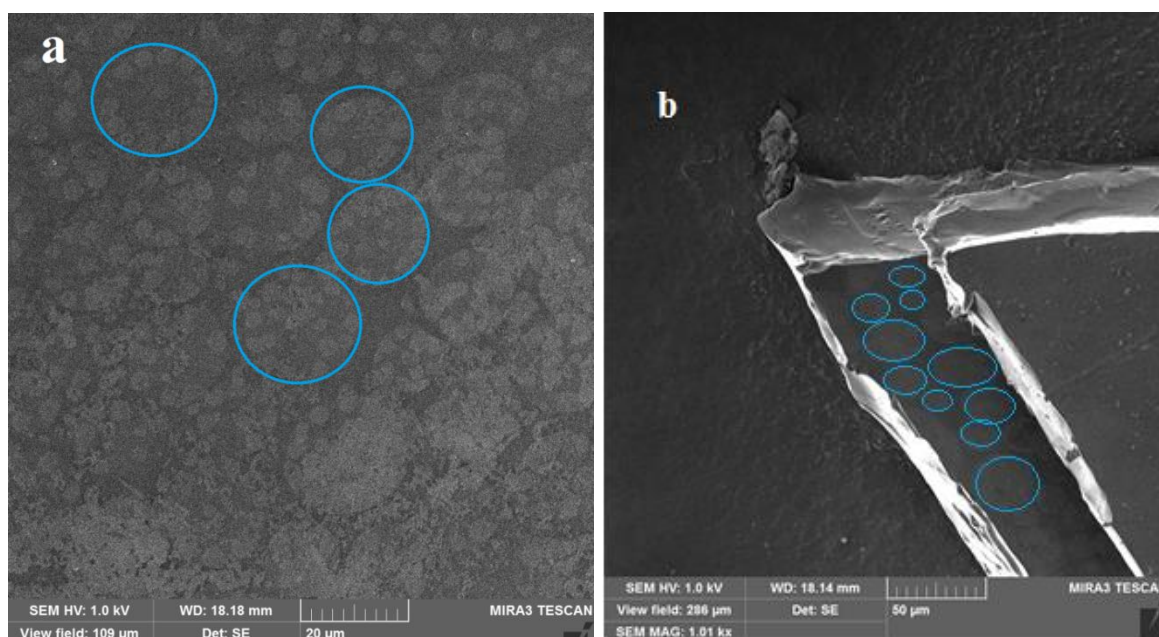


Рис. 4.22. Фотографії поверхні криогелю ПВС з іммобілізованим лізоцимом (а) і зрізу криогелю (b) (а - 20 мкм, b - 50 мкм) (окреслені пори криогелю ПВС).

При дослідженні термопрофілю активності лізоциму, що вивільнився з гелю відзначено, що кріоіммобілізація не призводить до його деформації і температурний оптимум залишається незмінним як для вільного, так і для іммобілізованого ензиму і становить 55°C (рис. 4.23).

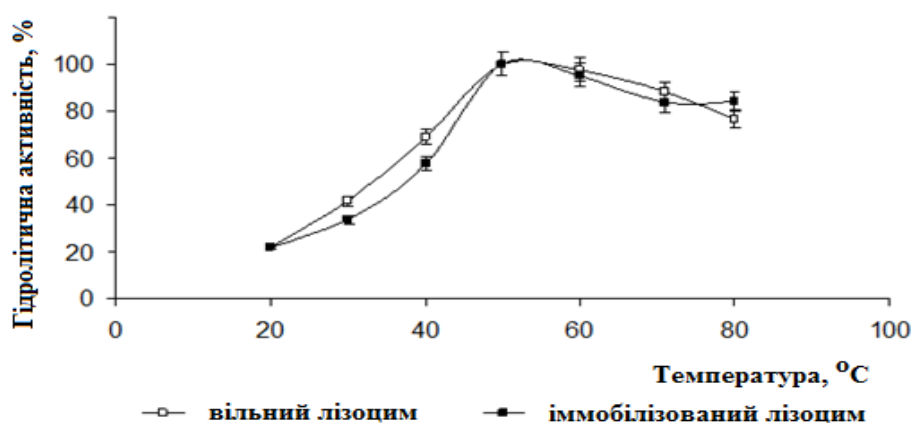


Рис. 4.23. Термопрофіль гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму (Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 0,1 моль/дм³)

При дослідженні термостабільності іммобілізованого лізоциму в порівнянні з вільним ензимом не відзначено істотних змін (рис. 4.24). Значення констант термоінактивації для вільного і іммобілізованого ферментів суттєво не відрізняються і складають $K_{in} = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$, $K_{in} = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$, відповідно. Таким чином, кріоіммобілізація в полівініловий спирт не впливає на термостабільність ензиму.

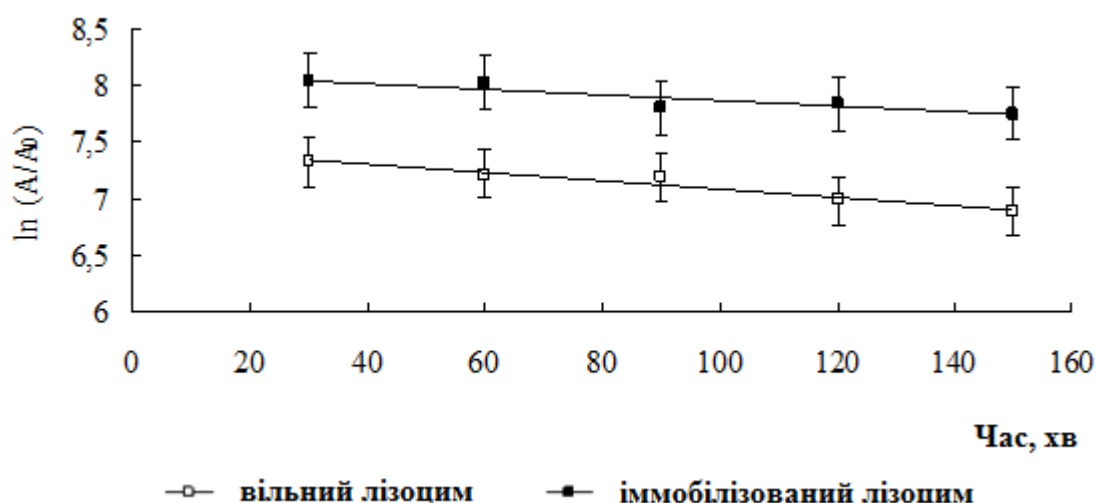


Рис. 4.24. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від часу інкубації (при 80 °С) (Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 0,1 моль/дм³)

Дослідження рН - профілю гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму свідчить про його розширення для іммобілізованого препарату на 1-1,5 одиниці в область кислих значень, що можна пояснити властивостями полімерної матриці, яка змінює мікрооточення лізоциму (рис. 4.25).

Дослідження рН-стабільності іммобілізованого лізоциму проводили в умовах, що моделюють рН ранового вмісту (рН 5,5). Результати досліджень показали, що іммобілізований препарат зберігав високу активність (близько

80%) в кислому середовищі протягом 3 год, в той час як вільний лізоцим активний не більше 1 год (рис. 4.26).

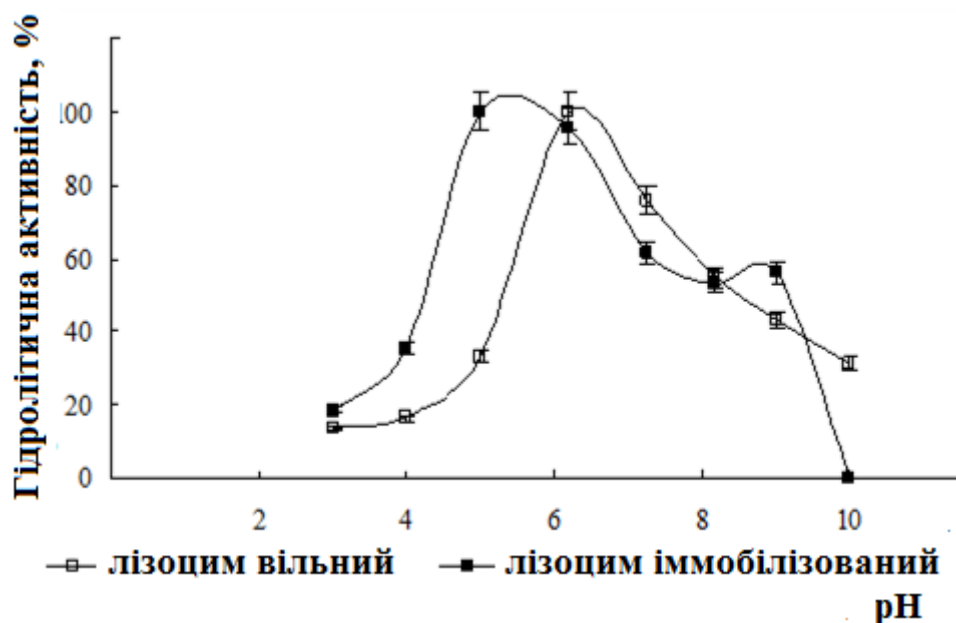


Рис. 4.25. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від pH інкубаційного середовища

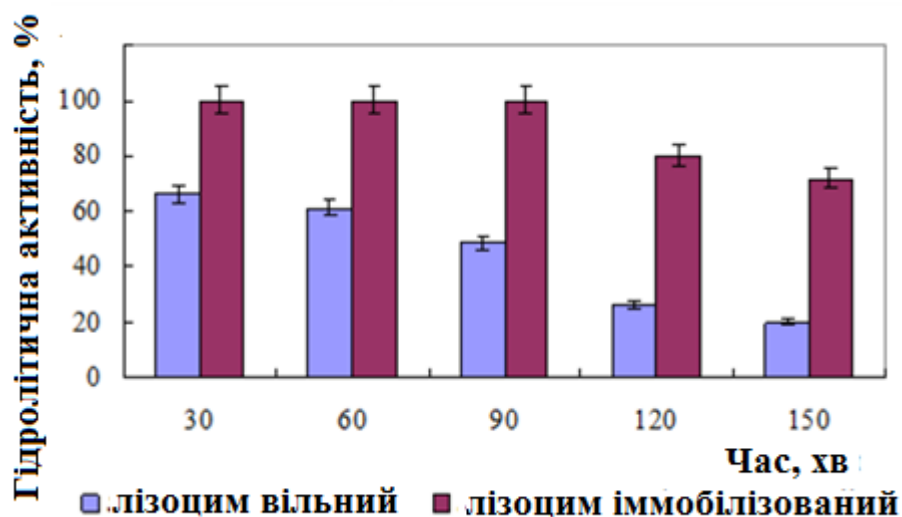


Рис. 4.26. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від часу інкубації, pH 5,5

Для збільшення строків зберігання і розширення спектру антимікробної дії в кригель з іммобілізованим лізоцимом додавали біглюконат

хлоргексидину. Це дозволило збільшити час зберігання препарату до 3 місяців при повному збереженні активності.

Розчин хлоргексидину біглюконату має бактерицидну дію. З даних літератури відомо, що механізм дії оснований на здатності хлоргексидину змінювати властивості клітинної мембрани мікроорганізмів. Після дисоціації солей хлоргексидину катіони, що утворилися, вступають в реакцію з оболонками бактерій, які мають негативний заряд. При цьому ліпофільні групи препарату сприяють дезагрегації ліпопротеїнової мембрани бактерій, в результаті чого відбувається порушення осмотичної рівноваги і втрата калію і фосфору клітинами бактерій. Під дією препарату відбувається руйнування цитоплазматичної мембрани, наслідком чого є загибель бактерій [216].

4.5.2 Дослідження антимікробної дії кріогелю з іммобілізованим лізоцимом

Мікробіологічні дослідження проводили в лабораторії мікробіології ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П.Філатова НАМН України" сумісно з проф., д.м.н. О.П. Сотніковою і А.Л. Молодою. Отриманий кріогель характеризується бактерицидною антимікробною дією стосовно тест-штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K59912 / 4, *Candida albicans* ATCC 885 — 653 (табл. 4.15).

Таблиця 4.15.

Антимікробна дія кріогеля з лізоцимом ** ($n=5$)

Тест-штам мікроорганізму	Д.з.з.р., см ($M \pm m$)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 F-49	$1,7 \pm 0,15$ (* $P < 0,05$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 415	$1,1 \pm 0,10$ (* $P < 0,05$)
<i>Escherichia coli</i> 055 K59912 / 4	$1,2 \pm 0,13$ (* $P < 0,01$)
<i>Candida albicans</i> ATCC 885 — 653	$1,3 \pm 0,11$ (* $P < 0,05$)

Д.з.з.р. - діаметр зони затримки росту

** кріогель без лізоциму не чинить антимікробної дії

Найбільш чутливими до дії іммобілізованого лізоциму виявилися *Staphylococcus aureus*, а найменш – *Pseudomonas aeruginosa*, діаметри зони затримки росту склали 1,7 см і 1,1 см відповідно.

4.5.3 Дослідження лікувально-профілактичної дії кріогелю з лізоцимом

Біологічні експерименти проводилися спільно з чл.-кор. УААН, д.б.н., проф. А.П. Левицьким в ДУ «Інститут стоматології і щелепно-лицевої хірургії НАМН України».

Дослідження були проведені на 30 щурах лінії Вістар, розділених на 6 груп. Попередньо всі щури отримували на слизові оболонки порожнини рота (СОПР) аплікації гелю з ліпополісахаридом (ЛПС). Через 30 хв після нанесення гелю з ЛПС здійснювали аплікацію гідрогелевих плівок. У гомогенаті СОПР визначали активність еластази, уреази, лізоциму, каталази, вміст малонового діальдегіду (МДА), а також ступінь дисбіозу і антиоксидантно-прооксидантний індекс (АПІ) і вміст гіалуронової кислоти.

У табл. 4.16 наведені результати визначення в слизовій оболонці порожнини рота активності еластази та уреази.

Таблиця 4.16.

Вплив кріогелю на активність ферментів у слизовій оболонці порожнини рота щурів після аплікації ліпополісахариду (ЛПС)

№	Група	Еластаза, нкат/кг		Уреаза, мккат/кг	
		СО ясен	СО щоки	СО ясен	СО щоки
1	Норма (Без аплікації)	32±2	31±2	0,34±0,09	0,82±0,09
2	ЛПС (контроль)	43±3 p<0,05	40±1 p<0,01	0,81±0,10 p<0,01	1,87±0,1 p<0,001
3	ЛПС+кріогель	40±2 p<0,05	34±1 p>0,05 p ₁ <0,01	0,73±0,09 p<0,05 p ₁ >0,3	1,60±0,11 p<0,001 p ₁ >0,05

Продовження табл. 4.16

4	ЛПС+ кріогель Na ₂ ЕДТА	з	41±4 p<0,05	35±3 p>0,05 p ₁ <0,05	0,66±0,10 p<0,05 p ₁ >0,3	1,58±0,14 p<0,001 p ₁ >0,05
5	ЛПС+ кріогель ХГБГ	з	37±3 p<0,05	35±1 p>0,05 p ₁ <0,05	0,78±0,09 p<0,05 p ₁ >0,6	1,53±0,13 p<0,01 p ₁ <0,05
6	ЛПС+ кріогель лізоцимом+ХГБГ+ Na ₂ ЕДТА	з	38±2 p>0,05 p ₁ >0,05	34±2 p>0,05 p ₁ <0,05	0,70±0,11 p<0,05 p ₁ >0,3	1,32±,10 p<0,01 p ₁ <0,01

Примітка: в табл.4.17 и 4.18: *p* – в порівнянні з с 1-ою групою; *p*₁ – в порівнянні з 2-ою групою; СО – слизова оболонка

З представлених даних видно, що в яснах і щоці активність еластази при дії ЛПС достовірно підвищується. Аплікація гідрогелевих плівок з лізоцимом на яснах незначно впливає на цей показник, незалежно від виду агента в складі плівки. Аплікація гідрогелевих плівок на слизову оболонку щоки достовірно (на 14%) знижує активність еластази, причому суттєвої різниці між окремими діючими агентами не виявлено.

Результати визначення активності уреазі, маркера мікробного обсіменіння показали, що рівень ензиму при дії ЛПС підвищується більше, ніж удвічі, під впливом гідрогелевих плівок дещо знижується в яснах, а також достовірно знижується в слизовій оболонці щоки при використанні кріогелю комплексної дії - на 50 % .

У табл. 4.17 представлені також результати визначення активності лізоциму, що відображають рівень неспецифічного імунітету. Виходячи з даних таблиці, ЛПС знижує цей показник в 2,4 рази в яснах і в 3,6 рази в щоці. Аплікація кріогелю у всіх випадках достовірно підвищує його в яснах, але незначно впливає на знижену активність лізоциму в слизовій оболонці щоки.

При дослідженні активності каталази в СОПР щурів після послідовних аплікацій ЛПС і кріогелю виявлено, що ЛПС проявляє тільки тенденцію до зниження активності ензиму, яка незначно змінюється під дією використаних

контрольного кріогелю, тоді як при дії препарату, що містить лізоцим, активність каталази в яснах підвищується більшою мірою.

Таблиця 4.17.

Вплив кріогелю з лізоцимом на активність ферментів у слизовій оболонці порожнини рота щурів після аплікації ліпополісахариду

№	Група	Лізоцим, од/мг тканини		Каталаза, мкат/кг ткани	
		СО ясен	СО щоки	СО ясен	СО щоки
1	Норма (без аплікації)	322±26	302±26	7,64±0,55	8,13±0,73
2	ЛПС (контроль)	134±17 p<0,001	83±9 p<0,001	6,92±0,58 p<0,3	7,12±0,47 p>0,1
3	ЛПС + кріогель ПВС	227±21 p<0,05 p ₁ <0,05	105±8 p<0,001 p ₁ >0,05	7,70±0,28 p>0,7 p ₁ >0,05	7,95±0,74 p>0,5 p ₁ >0,1
4	ЛПС + кріогель з Na ₂ ЕДТА	248±20 p<0,01 p ₁ <0,01	105±10 p<0,001 p ₁ >0,05	7,17±0,48 p>0,3 p ₁ >0,5	7,90±0,66 p>0,5 p ₁ >0,2
5	ЛПС + кріогель з ХГБГ	279±17 p<0,05 p ₁ <0,01	112±9 p<0,00 p ₁ <0,005	6,80±0,54 p>0,3 p ₁ >0,7	7,73±0,58 p>0,3 p ₁ >0,3
6	ЛПС + кріогель з лізоцимом+ХГБГ+ Na ₂ ЕДТА	217±24 p<0,05 p ₁ <0,05	112±12 p<0,01 p ₁ >0,05	7,68±0,42 p>0,8 p ₁ >0,2	7,67±0,70 p>0,5 p ₁ >0,3

Результати визначення в СОПР щурів вмісту малонового діальдегіду (МДА), біохімічного маркера запалення після аплікацій ЛПС і кріогелю показали, що ЛПС сприяє підвищенню рівня МДА, особливо в щоці, однак аплікація препарату проявляє тільки тенденцію до зниження даного показника (табл. 4.18).

Вивчення вмісту гіалуронової кислоти в яснах щурів показали, що ЛПС достовірно знижує її вміст, що може свідчити про підвищення проникненості тканин ясен для високомолекулярних речовин і мікробів. Гідрогелеві плівки, що містять лізоцим, достовірно підвищують вміст гіалуронової кислоти в яснах

(практично до норми), тоді як кріогель з Na_2EDTA і ХГБГ практично не впливає на знижений цей показник при дії ЛПС.

Таблиця 4.18.

Вплив кріогелю на вміст малонового діальдегіду і гіалуронової кислоти в слизових оболонках порожнини рота щурів після аплікацій ліпополісахариду

№	Група	МДА, мкмоль/кг		Гіалуронова кислота (ясна), мг/кг
		СО ясен	СО щоки	
1	Норма (без аплікації)	11,28±1,33	11,06±1,36	788,7±64,1
2	ЛПС (контроль)	14,87±1,24 $p>0,05$	15,51±1,35 $p<0,05$	505,7±36,2 $p<0,05$
3	ЛПС + кріогель ПВС	12,56±1,15 $p>0,3$ $p_1>0,1$	14,87±1,12 $p>0,05$ $p_1>0,3$	666,7±48,2 $p>0,05$ $p_1<0,05$
4	ЛПС + кріогель з Na_2EDTA	12,50±1,13 $p>0,3$ $p_1>0,1$	12,18±1,25 $p>0,3$ $p_1>0,05$	569,0±40,2 $p<0,05$ $p_1>0,3$
5	ЛПС + кріогель з ХГБГ	13,30±1,00 $p>0,1$ $p_1>0,3$	12,82±1,10 $p>0,3$ $p_1>0,1$	534,5±44,7 $p<0,05$ $p_1>0,3$
6	ЛПС + кріогель з лізоцимом+ХГБГ+ Na_2EDTA	13,85±1,12 $p>0,1$ $p_1>0,3$	13,07±1,12 $p>0,3$ $p_1>0,2$	688,7±62,1 $p>0,05$ $p_1<0,05$

На рис. 4.27 показано зміну ступеня дисбіозу в СОПР щурів, які отримували аплікації ЛПС і кріогелю. Видно, що при дії ЛПС ступінь дисбіозу в яснах підвищується більше, ніж в 5,6 раз, а в щоці - в 8,4 рази. Аплікація препарату на слизові оболонки у всіх випадках достовірно знижує ступінь дисбіозу, хоча і не приводить цей показник до норми. Ступінь дисбіозу максимально знижується в слизовій оболонці щоки при дії кріогелю, що містить всі три досліджуваних агенти.

АПІ, навпаки, при дії ЛПС достовірно знижується (в середньому в 1,5 рази), а при аплікації кріогелю підвищується, причому в більшості випадків достовірно (рис. 4.28).

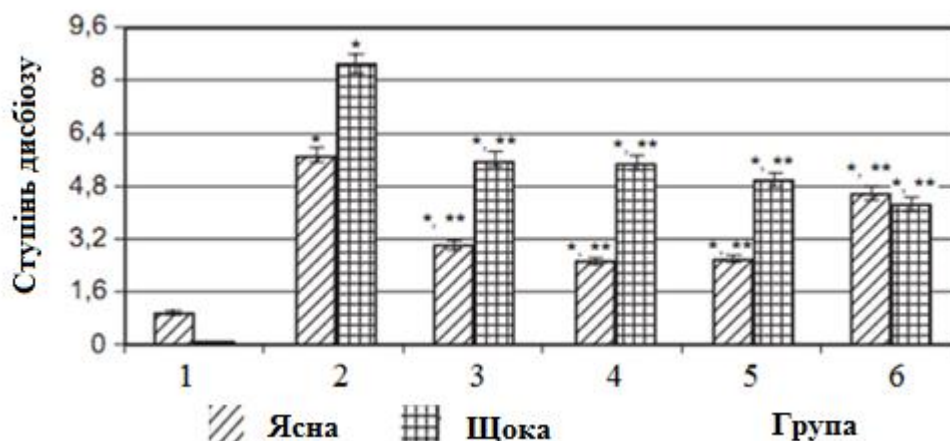


Рис. 4.27. Вплив кріогелю на ступінь дисбіозу в слизовій оболонці порожнини рота після аплікації гелю з ліпополісахаридом (номер групи відповідає номеру групи в табл. 4.18).

* - достовірна різниця з 1-ої групою; ** - достовірна різниця з 2-ї групою

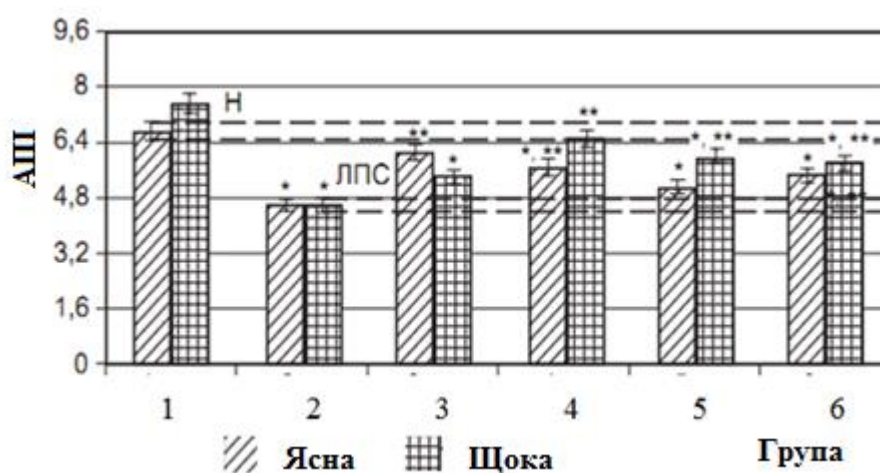


Рис. 4.28. Вплив кріогелю на антиоксидантно- прооксидантний індекс в слизовій оболонці порожнини рота після аплікацій гелю з ліпополісахаридом (номер групи відповідає номеру групи в табл. 4.18)

*- достовірна різниця з 1-ої групою; ** - достовірна різниця з 2-ї групою

Виходячи з отриманих результатів, ліпополісахарид є патогенним фактором в порожнині рота, це узгоджується з даними літератури [230, 231].

Кріогель з лізоцимом проявляє протизапальний і антиоксидантний ефекти на слизові оболонки порожнини рота після дії ЛПС, причому переважно за

рахунок стабілізації рівня гіалуронової кислоти, яка, як відомо, є міжклітинним «цементом», що визначає проникність гістогематичних бар'єрів.

Таким чином, запропоновано спосіб кріоіммобілізації лізоциму в полівініловий спирт. Отримано покриття з кількісним збереженням білка і високою гідролітичною активністю ензиму. Препарат характеризується розширеним рН-профілем гідролітичної активності лізоциму в області кислих значень, стабілізований в кислому середовищі і зберігає 95% активності (3 місяці). Іммобілізований лізоцим проявляє виражену бактерицидну дію стосовно тест-штамів *Staphylococcus aureus* і бактериостатичну стосовно тест-штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Показано, що іммобілізований лізоцим чинить протизапальну і антидисбіотичну дії при моделюваному ліпополісахаридом запаленні слизових оболонок порожнини рота.

4.6 Розробка мукоадгезивних плівкових форм іммобілізованого лізоциму

Вибір лікарської форми того чи іншого препарату визначається багато в чому особливостями перебігу захворювання, його локалізацією, етіологією та багатьма іншими факторами. Очевидно, що існують запальні процеси, де вектор всмоктування і час дії ензиму повинні бути строго обмежені для досягнення найбільш високої терапевтичної ефективності. Мукоадгезивні полімерні плівкові форми є найбільш придатною лікарською формою для створення таких препаратів.

4.6.1 Іммобілізація лізоциму в полімерну матрицю на основі желатину і Na-КМЦ

Як носії для іммобілізації лізоциму були обрані мукоадгезивні полімери

медичного застосування - желатин і Na-КМЦ, що характеризуються високою гідрофільністю, великою кількістю функціональних груп, здатністю утворювати іонні або водневі зв'язки з біологічно активними речовинами [232, 233]. Дослідження взаємодії лізоциму з окремими компонентами полімерної матриці (желатин, КМЦ, КМЦ + желатин) проводили раніше (п. 4.1), а також визначали приведену в'язкість водних розчинів полімерів (рис. 4.29). Зменшення в'язкості розчину желатину з лізоцимом і її збільшення в разі Na-КМЦ - лізоцим свідчить про наявність взаємодій між полімерами.

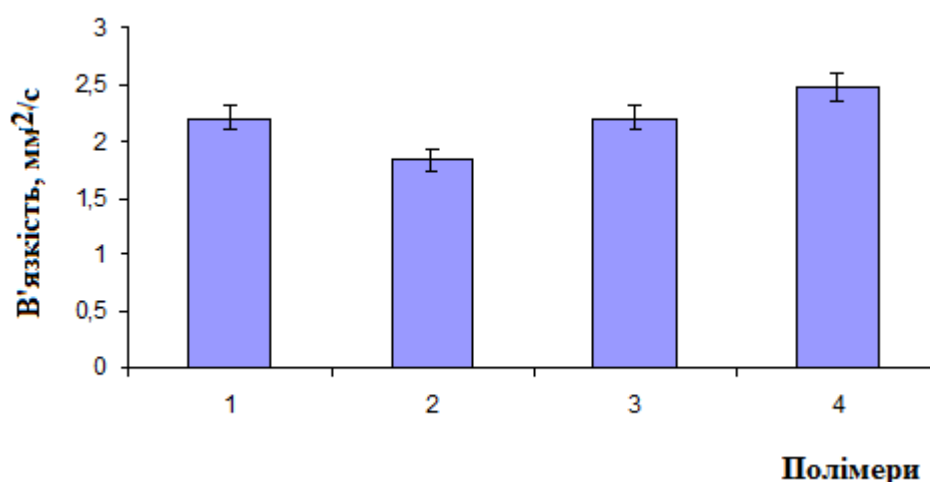


Рис. 4.29. Наведена в'язкість розчинів желатину (37 °C): 1 - желатин; 2 - желатин + лізоцим; 3 - желатин + Na-КМЦ; 4 - желатин + лізоцим + Na-КМЦ

З огляду на отримані раніше результати реологічних, мас-спектрометричних і спектрофотометричних експериментів, що свідчать про взаємодію обраних як носіїв полімерів і лізоциму, розроблено ефективний метод іммобілізації ензиму в полімерну матрицю на основі желатину і Na - КМЦ з кількісним збереженням гідролітичної активності.

Результати дослідження масових відношень лізоцим: желатин показали, що в умовах 1: 3,5 і 1: 5, спостерігається повне включення білка зі збереженням високої активності лізоциму (табл. 4.19).

Таблиця 4.19.

Склад мукоадгезивних полімерних плівок

Вміст компонентів плівки (мг / плівка)				Вміст води (%)
Лізоцим (масове відношення лізоцим: желатин)	Желатин	Na–КМЦ	Гліцерин	
2 (1:1)	2	0,1	0,005	10
2 (1:2,5)	4,0	0,2		
2 (1:3)	5,5	0,25		
2 (1:3,5)	6,7	0,34		
2 (1:5)	10	0,5		

Основні характеристики мукоадгезивних плівок, отриманих в результаті включення ферменту в полімерну матрицю на основі желатину з додаванням Na- КМЦ, наведені в таблиці 4.20.

Таблиця 4.20.

Характеристика мукоадгезивних плівок з лізоцимом

Показник, одиниці виміру	Результат визначення
Гідролітична активність плівки, од	45050±1238
Вміст лізоциму в плівці, мг	2,0
Площа, см ²	0,8±0,1
Товщина, мм	0,35±0,02
Середня маса плівки, мг	8±0,02
Органолептичні показники	прозорі, гладкі, жовті
Час розчинення плівки у воді, фізіологічному сольовому розчині, хв при 37 °С	18±0,5

Продовження табл. 4.20

Вміст води, %	10,0±1,7
Активність після стерилізації γ-опроміненням (10-28 кГр)	45000±1200
Сила мукоадгезії, Па	4380±250

Слід зазначити досить сильні мукоадгезивні властивості отриманого препарату, оскільки сила його адгезії до слизової оболонки становить 4380 Па.

Результати SEM (скануючої електронної мікроскопії) показали певну нерівномірність поверхні желатину / Na-КМЦ з іммобілізованим лізоцимом (рис. 4.30).

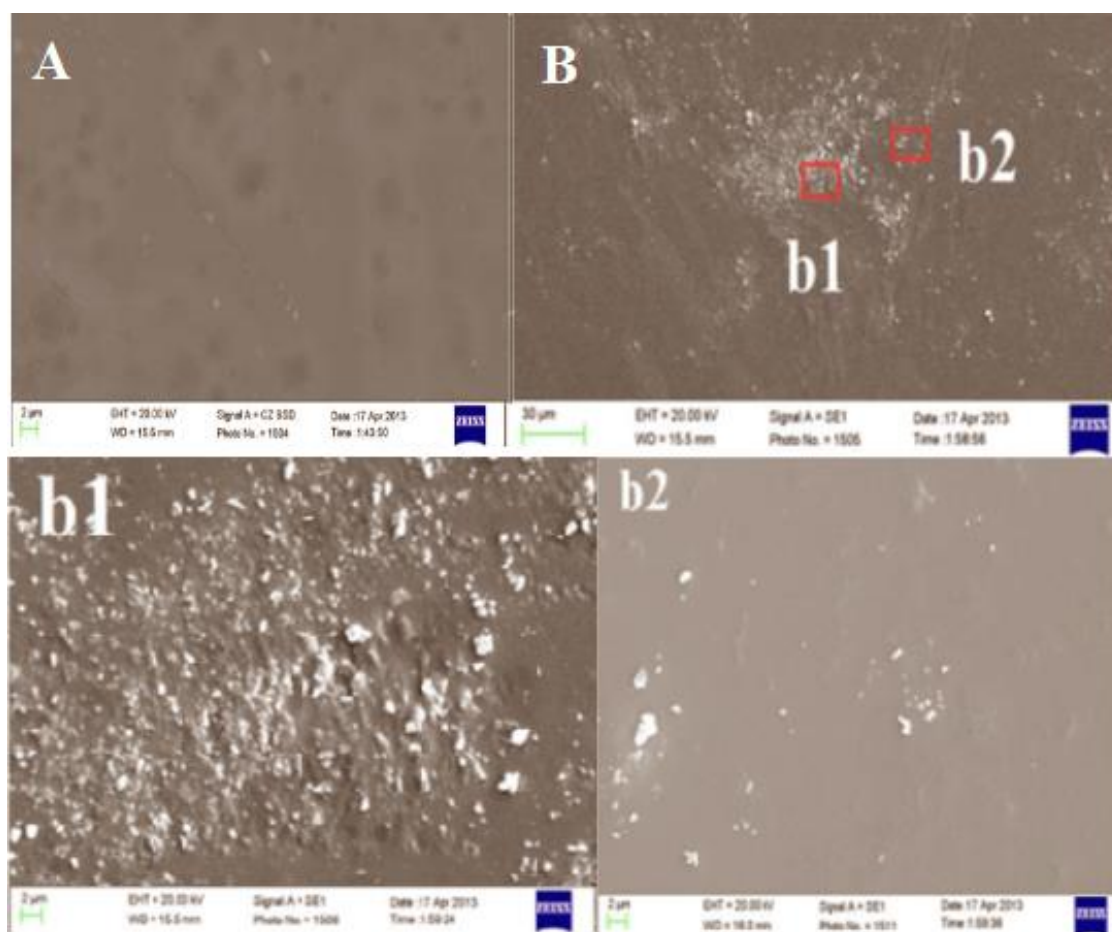


Рис. 4.30. Скануючі електронні мікрофотографії поверхні плівок желатину / Na-КМЦ (а) і желатину / Na-КМЦ з включеним лізоцимом (b - 3 мкм, b₁, b₂ - 2 мкм)

Наведені знімки демонструють, що полімерна система містить агломерати різного розміру, але не більше 3 мкм в діаметрі (приймаючи, що частинки мають сферичну форму).

Методом SEM виявлені відношення кількості елементів на поверхні плівок (рис. 4.31). Вуглець, кисень і азот є найбільш поширеними елементами поверхні мукоадгезивних плівок. Розподіл лізоциму на поверхні і в шарі полімерної плівки забезпечує поступове вивільнення ферменту, що підтверджується подальшими дослідженнями.

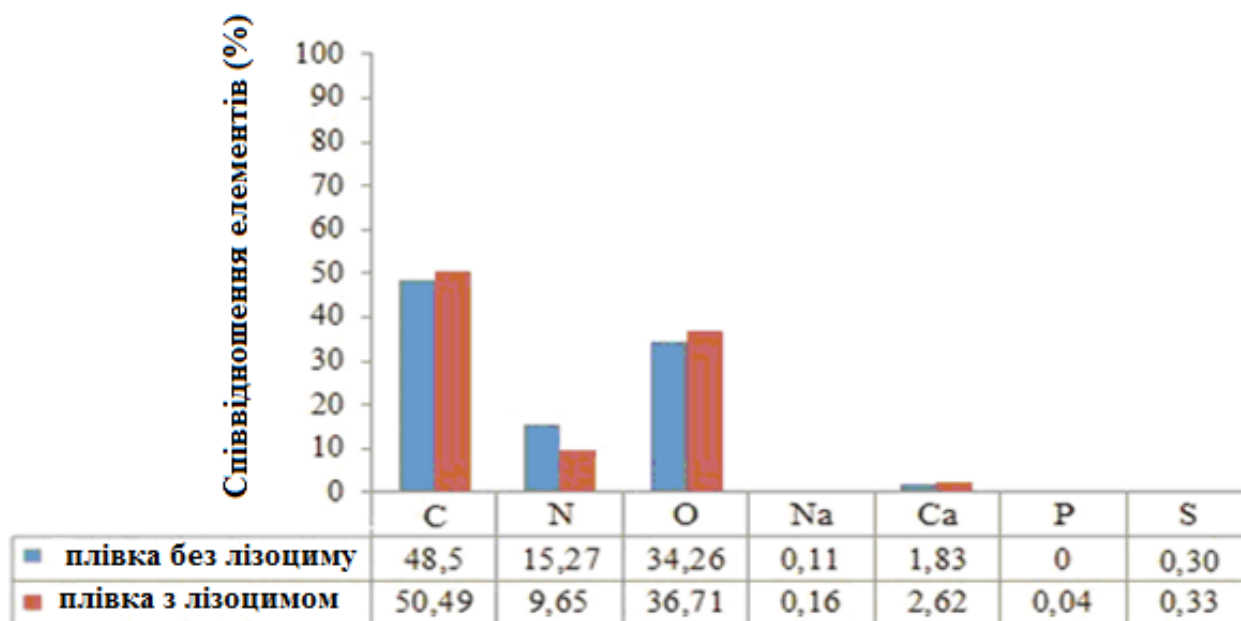


Рис. 4.31. Відношення елементів (%) на поверхні мукоадгезивних плівок при n = 9, отримане методом SEM

Вивчення динаміки вивільнення ферменту з полімерної матриці свідчить, що 100 % вихід спостерігається через 2 години інкубації в водному розчині (рис. 4.32). За перші 15-20 хвилин вивільняється близько 50 % ензиму, що зосереджений ймовірно на поверхні плівок, в наступні дві години спостерігається вихід другої половини іммобілізованого лізоциму.

Пролонгований кількісний вихід ензиму з полімерної матриці поряд зі зміною в'язкості желатину, дисоціацією олігомерів лізоциму на мономери, підтверджують наявність взаємодій білкових макромолекул.

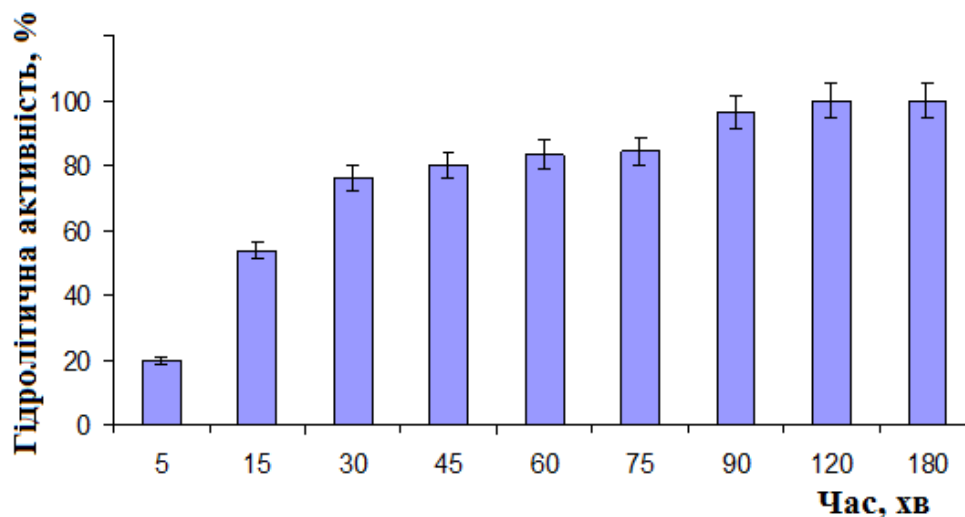


Рис. 4.32. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму від часу інкубації (0,1 моль/дм³ Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 37°C)

Дослідження залежності гідролітичної активності лізоциму від рН інкубаційного середовища (рис. 4.33) показало розширення рН-профілю і рН-оптимуму іммобілізованого ензиму в область кислих (на 0,5 од.) і лужних (на 1,0 од.) значень, що пояснюється стабілізуючим впливом матриці та створенням більш сприятливого мікрооточення лізоциму.

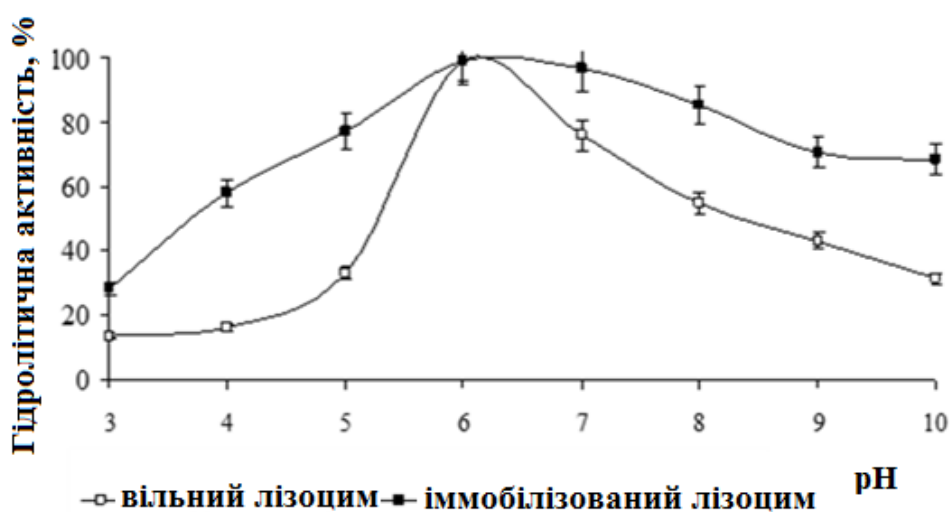


Рис. 4.33. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від рН інкубаційного середовища

При вивченні впливу температури на активність МАП з лізоцимом (рис. 4.34), показано незначне звуження термопрофілю активності ензиму в діапазоні 60-80 °С, в результаті часткової деструкції желатину в умовах високих температур, що, можливо, дестабілізує молекулу лізоциму.

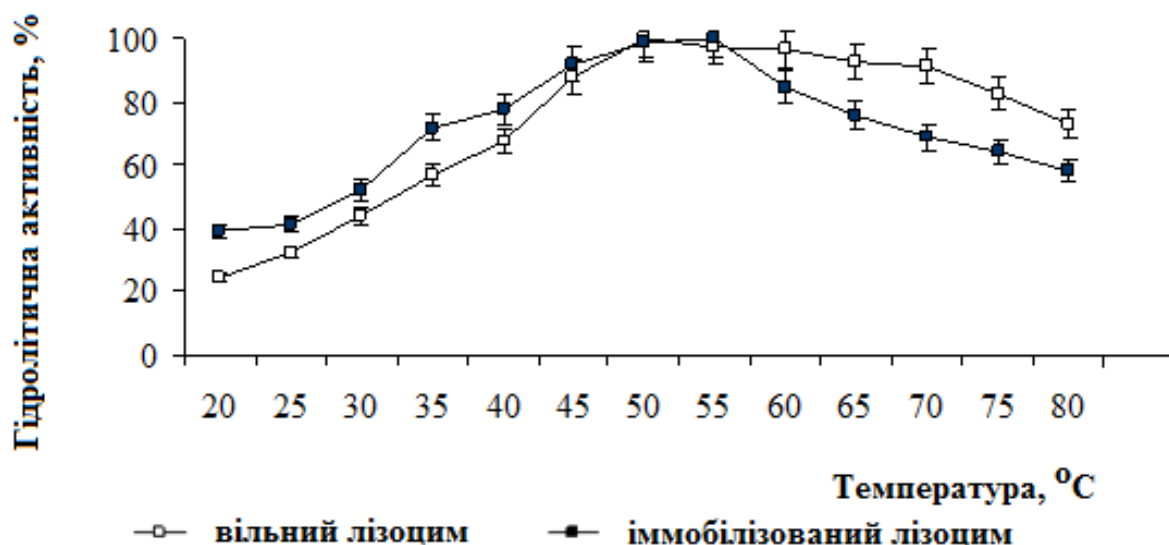


Рис. 4.34. Термопрофіль гідrolітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму (0,1 моль / дм³ Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2)

При дослідженні термостабільності вільного і іммобілізованого лізоциму (рис. 4.35) показано зниження константи термоінактивації для іммобілізованого ензиму в 1,7 раз. Так для вільного лізоциму $K_{in} = 9,2 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$, для іммобілізованого $K_{in} = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$. Отримані результати свідчать про більшу стійкість МАП з лізоцимом до дії високих температур (80 °С).

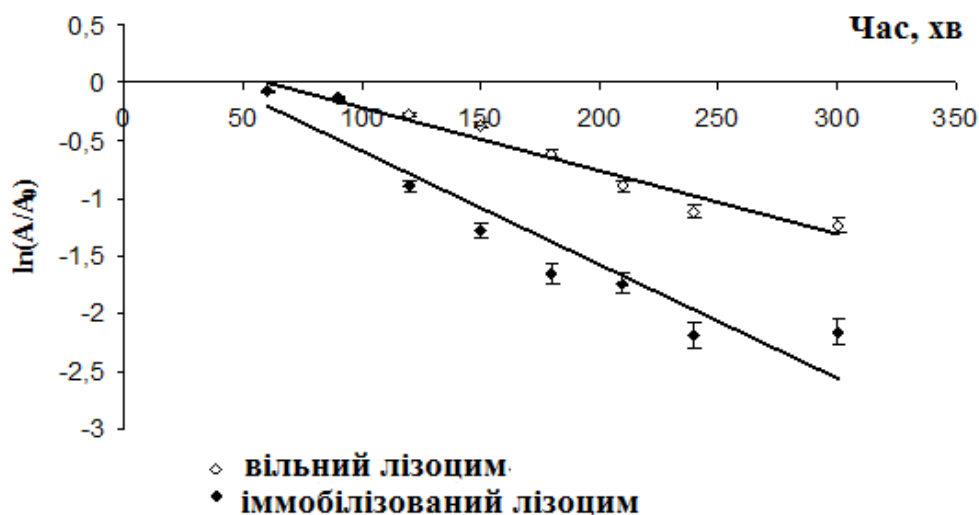


Рис. 4.35. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від часу інкубації при $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0,1 моль/дм³ Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2)

З огляду на те, що рН - оптимум лізоциму чітко виражений і становить 6,5 одиниць, представляло інтерес дослідити рН-стабільність ферменту в умовах, наближених до ацидозу (рН 5,5) (рис. 4.36).

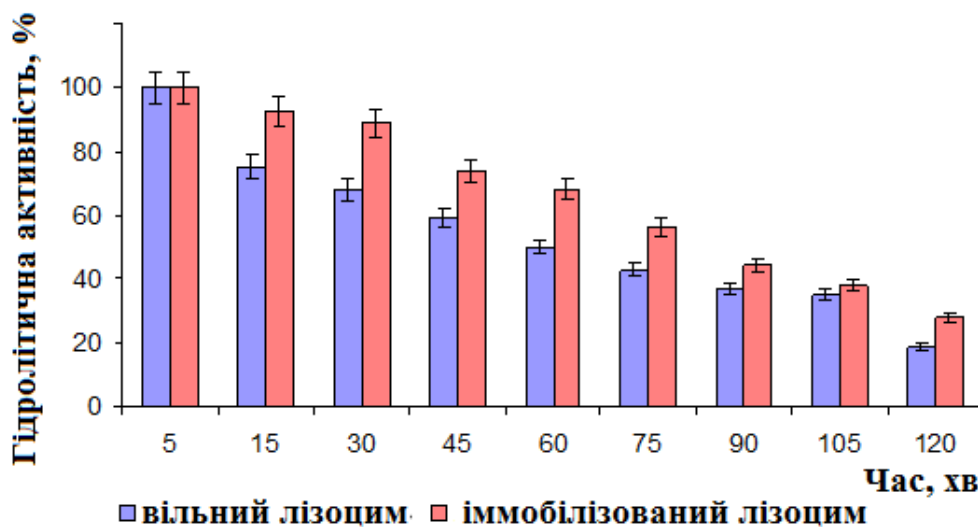


Рис. 4.36. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від часу інкубації при рН 5,5 (0,1 моль / дм³ Na-фосфатний буферний розчин)

Активність як іммобілізованого, так і вільного лізоциму з часом суттєво знижується, однак в разі іммобілізованого ензиму це відбувається більш плавно: гідролітична активність МАП з лізоцимом через 30 хвилин інкубації на 24% перевищує таку вільного ензиму.

Час збереження активності мукоадгезивних плівок з лізоцимом вивчали протягом 3-х років (рис. 4.37). Зразки зберігали герметично упакованими при температурі 4 ° С.

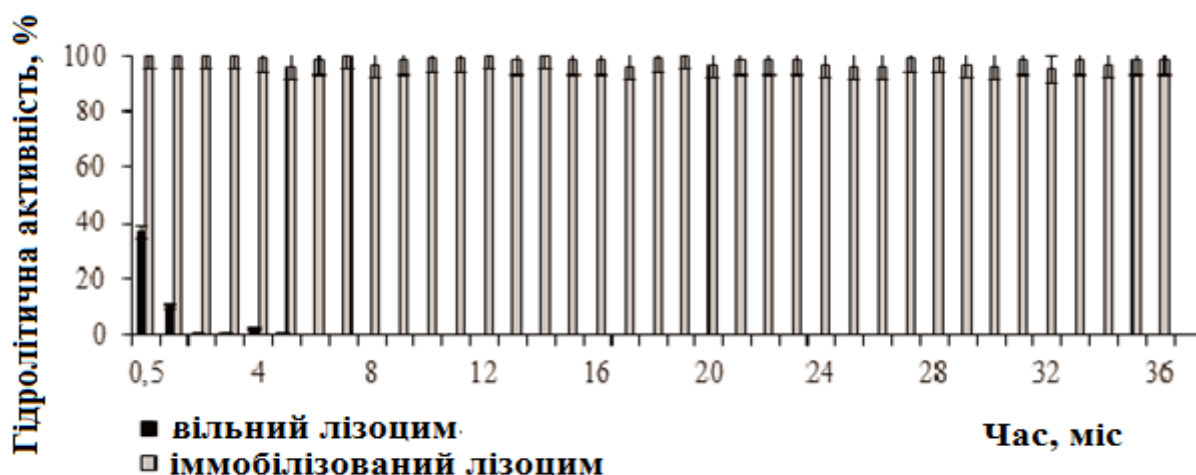


Рис. 4.37. Гідролітична активність комерційного і іммобілізованого лізоциму в процесі зберігання (4 °С) (0,1 моль / дм³ Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2)

Показано, що вільний лізоцим повністю втрачає гідролітичну активність протягом 14-17 днів в буферному розчині, тоді як іммобілізований - зберігає активність на рівні 95-100% протягом 36 місяців дослідження.

4.6.2 Дослідження стерилізації γ-опроміненням мукоадгезивних плівок з іммобілізованим лізоцимом

Стерилізація лікарських засобів має велике практичне значення для забезпечення асептики. При застосуванні будь-якого методу стерилізації метою

є збереження структури і властивостей лікарського препарату при повному звільненні від мікроорганізмів.

Для білків і ензимів найчастіше використовують методи радіаційної стерилізації або додавання антисептичних допоміжних речовин. Стерилізацію МАП з лізоцимом проводили на ЗАТ «Гемопласт» (м. Білгород - Дністровський) відповідно до ДСТУ Р ІСО 11137-2000 «Стерилізація виробів медичного призначення».

З метою виявлення дозозалежності збереження гідролітичної активності плівок після γ -опромінення, стерилізацію проводили дозами 10, 18, 28 кГр. Вибір доз обумовлено «Вимогами до валідації і поточного контролю». Слід зазначити радіопротекторну дію желатину як полімерної матриці для лізоциму при стерилізації γ -опроміненням в зазначених дозах, оскільки іммобілізований ензим в усіх випадках зберігав 100 % гідролітичної активності (табл. 4.21).

Таблиця 4.21.

**Вплив стерилізації γ - опроміненням на гідролітичну активність
МАП з лізоцимом**

Доза γ -опромінення, кГр	Гідролітична активність	
	од/мг	%
10	45050 \pm 2252	100
18	45019 \pm 2250	100
28	44878 \pm 2244	100

Проведені дослідження зразків МАП після γ -опромінення на стерильність в аеробних і анаеробних умовах показали, що плівки стерильні.

**4.6.3 Дослідження антимікробної дії мукоадгезивних лікарських
плівок з лізоцимом**

Дослідження антимікробної дії МАП з лізоцимом проводили сумісно з завідуючою лабораторією мікробіології ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України" Молодою А.Л.

Результати дослідження показали, що мукоадгезивні плівки з лізоцимом чинять антимікробну дію як щодо грампозитивних, так і деяких грамнегативних мікроорганізмів (рис. 4.38).

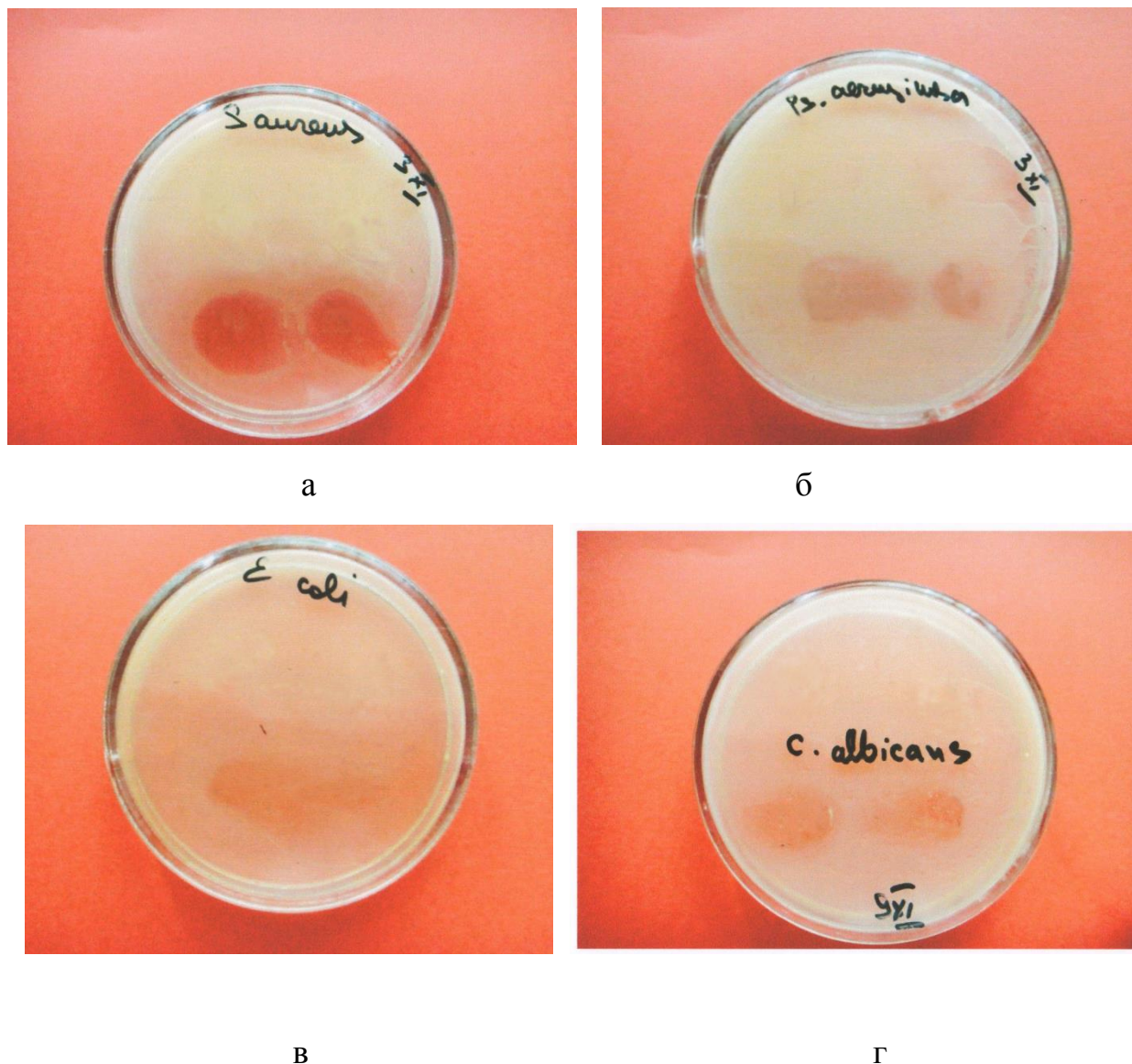


Рис. 4.38. Антимікробна дія МАП з лізоцимом:
а – *Staphylococcus aureus* , б – *Pseudomonas aeruginosa*,
в - *Escherichia coli*, г - *Candida albicans*.

Максимальна бактеріостатична дія відзначена для *Staphylococcus aureus* (д.з.з.р. 1,65 см). Активність щодо трьох інших штамів була дещо меншою

(д.з.з.р. 1,0-1,2 см). Отримані результати вказують на те, що лізоцим дифундує в агар з полімерних плівок і пригнічує ріст мікроорганізмів (табл. 4.22).

Таблиця 4.22.

Антимікробна дія мукоадгезивних плівок

Тест-штам мікроорганізму	Діаметр зони затримки росту, см	
	Плівка з лізоцимом	Контрольна плівка (без лізоциму)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923F-49	1,65 ± 0,15	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 415	1,0 ± 0,10	
<i>Escherichia coli</i> 055 K59912 / 4	1,1 ± 0,13	
<i>Candida albicans</i> ATCC 885 – 653	1,2 ± 0,13	

*Примітка: P<0,05, n=5

4.6.4 Експериментальна оцінка біодоступності і протизапальної дії МАП з іммобілізованим лізоцимом

Біологічні експерименти з вивчення біодоступності і протизапальної дії МАП з лізоцимом проводилися під керівництвом чл.-кор. УААН, д.б.н., проф. Левицького А.П. в ДУ «Інституті стоматології і щелепно-лицевої хірургії НАМН України» і оцінювалися в двох серіях біологічних експериментів.

Результати I серії досліджень, де перевірялася здатність лізоциму дифундувати з плівки в слизову оболонку щоки щурів, представлені на рис. 4.39. Найвища концентрація лізоциму в тканині спостерігається після використання МАП з 1,0% вмістом ферменту і тривалості аплікації 15 хв.

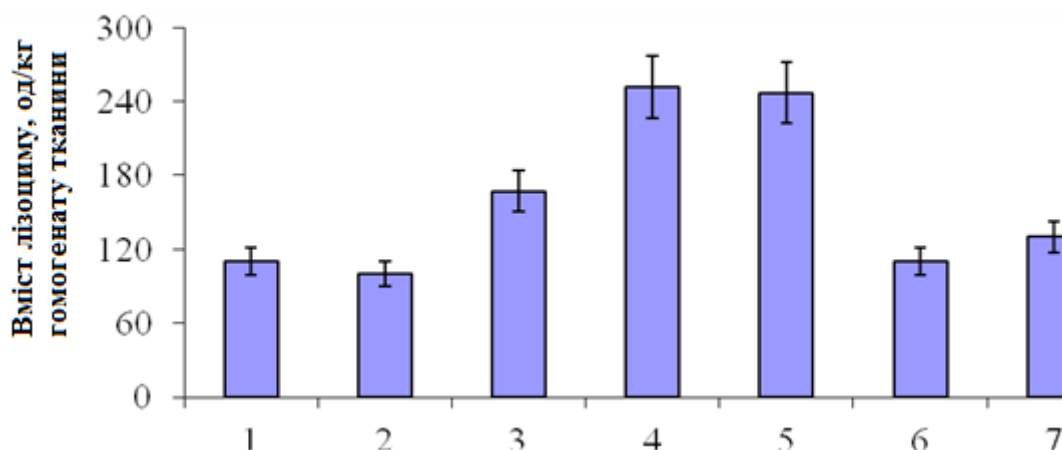


Рис. 4.39. Накопичення лізоциму у тканині СОПР щурів після накладення МАП з лізоцимом: 1 - контроль, 2 - концентрація лізоциму 0,1% (20 хв), 3 - концентрація лізоциму 0,5% (20 хв), 4 - концентрація лізоциму 1,0% (20 хв), 5 - концентрація лізоциму 1,0% (15 хв), 6 - концентрація лізоциму 1,0% (10 хв), 7 - концентрація лізоциму 1,0% (5 хв)

Результати II серії експериментів, в якій досліджували вплив МАП з лізоцимом на перебіг запальних процесів в СОПР, представлені на рис. 4.40.

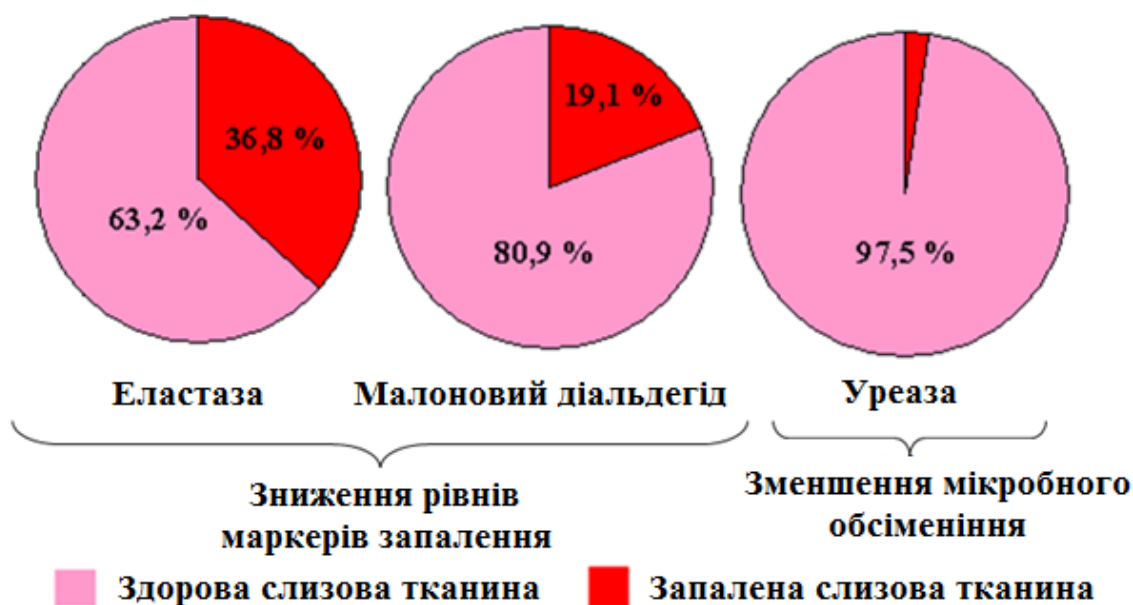


Рис. 4.40. Вплив МАП з лізоцимом на біохімічні показники СОПР щурів при експериментальному стоматиті.

Моделювання стоматиту викликає збільшення рівня маркерів запалення (еластази і МДА), суттєве (в 2,6 рази) зростання активності уреазі і виражену тенденцію до збільшення активності лізоциму.

Отримані мукоадгезивні лікарські плівки з лізоцимом ефективні в лікуванні експериментального стоматиту у щурів: рівні маркерів запалення (еластази, малонового діальдегіду) та мікробне обсіменіння слизових оболонок знижуються на 63,2, 80,9 і 97,5%, відповідно.

Висновки до розділу 4.

Таким чином, в розділі 4 представлені системи антимікробної дії зі стабілізованим, хімічно або фізично іммобілізованим лізоцимом, а саме, полімерний розчин «штучна сльоза з лізоцимом», гелі з лізоцимом і кверцетином, кріогель і полімерні плівки з ензимом. Як стабілізатори або носії використовували полімери, дозволені до медичного застосування, з мукоадгезивними властивостями, що забезпечують кількісне збереження білка і гідролітичної активності лізоциму, пролонговану дію, тривалі строки зберігання.

Ефективність іммобілізації підтверджена розширенням рН-профілю гідролітичної активності лізоциму, стабілізацією в кислому середовищі, збереженням вихідної активності після стерилізації γ - опроміненням.

Встановлено антимікробну дію розроблених препаратів щодо тест-штамів музейних культур *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Також в біологічних експериментах на моделях травматичного кератиту, експериментального гінгівіту і стоматиту показано зниження значень маркерів запалення, рівня мікробного обсіменіння, що підтверджує ефективність розроблених мукоадгезивних систем зі стабілізованим / іммобілізованим лізоцимом.

За матеріалами даного розділу опубліковані наступні роботи:

1. И. Романовская, С. Декина, С. Андронати. Конструирование иммобилизованных белковых веществ. – Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG., 2012. – 335 с.
2. Декіна С.С., Левицький А.П., Романовська І.І., Дем'яненко С.О. Протизапальна дія мукоадгезивних плівок з іммобілізованим лізоцимом на слизову оболонку щоки щурів // Одеський медичний журн. -2011. - № 4. – С. 7-9.
3. Декина С.С., Демьяненко С.А., Левицкий А.П., Романовская И.И. Экспериментальная оценка противовоспалительного действия мукоадгезивных лечебных пленок с лизоцимом // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - № 8. – С. 39-42 (РИНЦ)
4. Романовська І.І., Сотнікова О.П., Декіна С.С., Шестеренко Є.А.. Фізико-хімічні властивості і офтальмонешкідливість очної лікарської мазі з лізоцимом // Медична хімія.- 2012 - Т.14, №3(52).-С.52-55.
5. Декина С.С., Романовская И.И., Овсепян А.М., Молодая А.Л., Пашкин И.И. Иммобилизация лизоцима в криогель поливинилового спирта // Biotechnologia Acta – 2014. – Т.7, № 3. – С. 69-73.
6. Левицький А.П., Романовська І.І., Декіна С.С., Овсепян А.М., Томіліна Т.В., Хромагіна Л.М., Кнава О.Е. Лікувально – профілактична дія мукоадгезивних плівок з лізоцимом на слизову оболонку порожнини рота після аплікації ліпополісахариду // Одеський медичний журнал.- 2014.- № 4 (144). – С. 9-13.
7. Dekina S.S., Romanovskaya I.I., Ovsepyan A.M., Balashova M.V. Sterilization of ocular medical inserts with immobilized proteins // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2015. – V.49 (4). – P.275-279 (Scopus, Web of Science)
8. Декіна С.С., Романовська І.І., Леоненко І.І., Єгорова А.В. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом: отримання,

- властивості // *Biotechnologia Acta*. – 2015. -Т. 8, № 3. – С. 104-109 (Open Academic Journals Index, Index Copernicus та ін.)
9. Романовська І.І., Декіна С.С., Овсепян А.М., Левицький А.П. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2015. – №3. – С. 30-40.
 10. Декіна С.С., Романовська І.І., Сотнікова О.П. Лізоцимвмісний препарат "штучна слюза": отримання, властивості // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2015. -№ 4(32). – С.46-52.
 11. Dekina S., Romanovska I., Ovsepyan A., Tkach F., Muratov E. Gelatin/carboxymethyl cellulose mucoadhesive films with lysozyme: development and characterization // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V. 147. – P. 208–215 (Scopus, Web of Science).
 12. Романовська І.І., Декіна С.С., Шестеренко Ю.А., Сотнікова О.П., Абрамова А.Б., Осташевський В.Л. Лізоцимвмісний препарат для слюзозамінної терапії: фармакотерапевтична ефективність // *Медична та клінічна хімія*. – 2018. –Т. 20, № 2. – С. 100-104 (Index Copernicus, Bielefeld Academic Search Engine)
 13. Romanovskaya I.I., Dekina S.S., Sotnikova E.P., Abramova A.B. Preparation and properties of lysozyme-containing eye drops for tear-substitutive therapy // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – Т.53, №8.- P. 755-758 (Scopus, Web of Science).
 14. Патент України на корисну модель № 72476. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 8/02 (2006.01), А61К 8/64 (2006.01), А61К 8/65 (2006.01) / Декіна С.С., Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 27.08.2012. Бюл. № 16.
 15. Патент України на винахід 99899. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 9/38 (2006.01), А61К 9/40 (2006.01), А61К 38/47 (2006.01), А61Р 31/00 / Декіна С.С., Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 10.10.2012. Бюл. № 19

16. Пат. 102170 Україна, МПК А61К 38/46 (2006.01), А61К 31/194 (2006.01), А61К 31/79 (2006.01). Антимікробний мукоадгезивний матеріал. / Декіна С.С., Романовська І.І., Овсепян А.М.; заявник та власник патенту Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України. — № у 2015 01595; заявл. 24.02.2015; опубл. 26.10.2015, Бюл. № 20.
17. Декина С.С., Овсепян А.М. Мукоадгезивные полимерные пленки с иммобилизованным лизоцимом // XIV Конференция молодых ученых и студентов - химиков южного региона Украины. – Одесса, 25-27 апреля 2012. – С. 47.
18. Чернецкая С.В., Слончак В.С., Овсепян А.М., Декина С.С. Исследование иммобилизации лизоцима в криогель поливинилового спирта // «Современные проблемы фармакологии, косметологии и аромологии» – Одесса, 20 сентября 2013. – С. 16-20.
19. Декина С.С., Овсепян А.М. Изучение стерилизации иммобилизованных белковых препаратов – перспективных лекарственных средств // XX Международная конференция «Ломоносов 2013» (8-13 апреля 2013, Москва). – С. 1-2.
20. Романовская И.И., Декина С.С., Овсепян А.М., Левицкий А.П. Лизоцимсодержащие полимерные мукоадгезивные пленки // Тез. докл. XI Украинского биохимического конгресса – Киев, 6-10 октября 2014. – С.163.
21. Овсепян А.М., Декина С.С. Мукоадгезивный гель с иммобилизованными лизоцимом и кверцетином // Мат. XVII Конференции молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием, 28 апреля – 1 мая. – Одесса, 2015. – С. 12.
22. Декіна С.С., Овсепян А.М., Романовська І.І. Розробка мукоадгезивного гелю бактеріолітичної дії // Мат. IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (16-17 жовтня 2014, Харків). – С. 215-216.

- 23.Ovsepyan A., Dekina S. Sterilization methods for medicinal films with immobilized proteins // International Conference for Young Scientists "Actual Problems of Microbiology and Biotechnology" (1-4 June 2015, Odesa). – P. 8
- 24.Романовская И.И, Декина С.С., Сотникова Е.П. Лизоцимсодержащий препарат для слезозаменительной терапии: получение, физико-химические свойства. // Мат. науково-практичної конф. офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» (19-20 травня 2016, Одеса). - С. 208.
- 25.Декіна С.С., Романовська І.І., Овсепян А.М., Сотнікова О.П., Левицький А.П. Мукоадгезивні лікарські форми лізоциму // Мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України «Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи» (13-16 вересня 2016, Харків). – С. 344.
- 26.Shesterenko Y., Dekina S., Romanovska I., Sevastyanov O. Polymeric materials with hydrolytic activity // International conference on biomaterials and biosensors “4th BIOMATSEN 2019” (Mugla, Turkey, 12-18 May 2019). - P. 128.

ГЛАВА 5. БІОТЕХНОЛОГІЯ СТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСНОГО АНТИБАКТЕРІАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ СУБЛІНГВАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

Перспективною лікарською формою лізоциму для місцевого застосування в комплексі з іншими біологічно активними речовинами є таблетки. В Україні таблетовані форми ензиму представлені препаратами - Лізак («Фармак», Україна), Гексаліз (Lab. Bouchara-Recordati, Франція) і Лісобакт (Bosnalijek, Боснія і Герцеговина). Однак препарати з іммобілізованим лізоцимом відсутні. Застосування ж технології іммобілізації з використанням мукоадгезивних полімерних матриць медичного призначення для цілеспрямованої стабілізації ферменту і пролонгування його дії визначає актуальність досліджень в даній області.

В ході попередніх досліджень, які проводилися в лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України, були розроблені підходи до іммобілізації біологічно активних білкових речовин (альбумінів, протеолітичних, ліполітичних, окиснювально-відновлювальних ферментів, алергенів).

В основному застосовували методи іммобілізації, ґрунтовані на нековалентних взаємодіях білків з полімерними матрицями природного і синтетичного походження (комплексоутворення і механічне включення в полімери), що дозволяють отримувати високоактивні і стабільні препарати.

Базуючись на результатах власних досліджень по створенню іммобілізованих БАР, перспективних для використання в медицині [234-237], спільно проведених і вищеописаних робіт з вченими ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» (створення мукоадгезивних полімерних гелів і плівок антибактеріальної дії з лізоцимом і кверцетином), детальному вивченні наукової літератури, визначили основні

підходи до розробки комплексного таблетованого препарату іммобілізованого лізоциму.

Визначальними критеріями при виборі полімерної матриці були відсутність токсичності, економічність, використання у фармацевтичній, медичній і харчовій промисловості.

Лікарською композицією обрали лізоцим і кверцетин - основні діючі речовини. На відміну від препаратів лізоциму, що випускаються, додавання кверцетину в діючу композицію дозволяє надати таблетці комплекс додаткових позитивних властивостей, а саме, капіляростабілізуючу, кардіо- та радіопротекторну, регенеративну, антиоксидантну, протизапальну, спазмолітичну та антисклеротичну дії. Позитивні терапевтичні властивості композиції лізоцим- кверцетин були показані раніше в дослідженнях по розробці мукоадгезивного гелю [237].

З метою розширення спектра антимікробної дії було запропоновано ввести в препарат динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти і хлоргексидину біглюконат.

Вибір динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (Na_2EDTA) обумовлений її антиоксидантними властивостями, застосуванням як консерванта в білкових препаратах, наприклад, інтерферону [238, 239] і дестабілізуючою грамнегативну бактеріальну клітину дією, за рахунок зв'язування іонів металів [240]. 3-D структура EDTA, утворена в результаті хелатування, міцно зв'язує іони металів з негативно зарядженими атомами кисню та азоту [241].

Проведені і описані дослідження із взаємодії лізоциму з полімерами (розділ 3), мукоадгезивні властивості, збереження високої активності, пролонгованість дії і тривалість зберігання розроблених препаратів (глава 4) склали наукову основу нового таблетованого препарату лізоциму і кверцетину.

На рис. 5.1 наведені результати досліджень впливу компонентів таблетки на гідролітичну активність лізоциму.

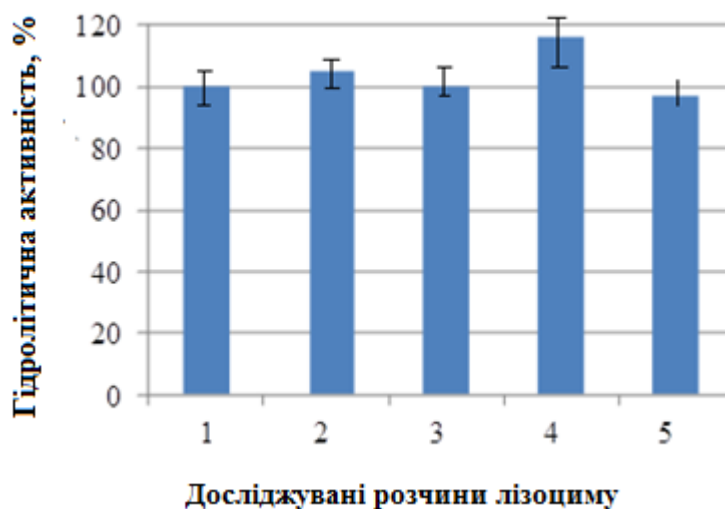


Рис. 5.1. Вплив компонентів таблетки на гідролітичну активність лізоциму. Вихідна активність 40000 од/мг.

Досліджувані розчини:

- 1 - ЛІЗ (2,5 мг/см³);
- 2 - 2,5 мг ЛІЗ + 1 см³ ХГБГ;
- 3 - 2,5 мг ЛІЗ + 1 см³ ХГБГ + 0,75 мг Na₂ЕДТА;
- 4 - 2,5 мг ЛІЗ + 0,75 мг Na₂ЕДТА;
- 5 - 2,5 мг ЛІЗ + 0,5 мг кверцетину

Результати визначення свідчать про відсутність інгібуючого або достовірно активуючого лізоцим ефекту щодо *Micrococcus lysodeikticus*.

5.1 Дослідження впливу полімерів на активність лізоциму і вміст компонентів таблетки.

Докладне вивчення взаємодії полімери-лізоцим описано в розділі 3. Спираючись на отримані результати, як носії для іммобілізації лізоциму і для отримання таблетованої лікарської форми розглядали полімери природного і синтетичного походження. Всі досліджувані полімери дозволені до медичного застосування і широко використовуються у фармацевтичній промисловості.

Як стабілізуючі компоненти, що забезпечують також мукоадгезивні властивості, використовували натрієву сіль карбоксиметилцелюлози і желатин, описані раніше, а також полівінілпіролідон і крохмаль, що часто застосовуються у фармацевтичній промисловості.

Збереження активності, рН-оптимуму і термооптимуму лізоциму в присутності полімерів представлено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

Вплив полімерів на біохімічні властивості лізоциму

Властивість	ЛІЗ	ЛІЗ +ПВП	ЛІЗ + Na-КМЦ	ЛІЗ + крохмаль	ЛІЗ + желатин
Гідролітична активність *, од/мг, $M \pm m$	20000 \pm 1000	19000 \pm 870	18500 \pm 850	16500 \pm 1050	19300 \pm 790
рН-оптимум	6,0-7,5				5,0-8,0
Термооптимум, °С	45-55				

* $P < 0,05$ при $n=5$

Виходячи з отриманих результатів, крохмаль певною мірою сприяє зменшенню активності лізоциму (82,5 % від вихідної). У разі інших полімерів відмінності в активності недостовірні.

Крім того, слід зазначити, що взаємодія лізоциму з Na-КМЦ і желатином раніше була підтверджена за допомогою реологічних, оптичних і мас-спектрометричних методів (п. 4.1).

Була відзначена значна зміна в'язкості розчину Na-КМЦ при додаванні лізоциму: з $2,63 \pm 0,08$ мм²/с до $3,39 \pm 0,09$ мм²/с, що становить 22,3% з високим ступенем достовірності ($P < 0,002$ при $n = 9$) [242].

Желатин є перспективним не тільки як носій для іммобілізації лізоциму, а й джерело цінних для організму людини білка і амінокислот. Основні кислоти желатину гліцин (~ 27%), пролін (~ 16%), окипролін (~ 14%), глутамінова кислота (~ 12%), аргінін (~ 9%), лізин (~ 5%) [233].

Основні фізико-хімічні характеристики функціонування лізоциму, іммобілізованого в желатин і Na-КМЦ (рН і термооптими активності, рН-, термостабільність гідролітичної активності), представлені раніше при розробці мукоадгезивних плівкових форм ензиму (п. 4.3.1).

Стабілізуючий лізоцим вплив полімерів був раніше зазначений в області кислих і лужних значень рН, а також при тривалому витримуванні ензиму в умовах, наближених до ацидозу (рН 5,5).

Вочевидь матриця на основі желатину і Na-КМЦ чинить протекторну дію, захищаючи лізоцим від негативного впливу кислих і лужних значень рН. Крім того, протективна дія желатину може проявлятися і в відношенні протеаз до організму людини. Будучи частково гідролізованим білком колагену, желатин має більшу кількість доступних пептидних зв'язків для протеаз, на відміну від лізоциму. Описані результати досліджень обумовлюють вибір желатину і Na-КМЦ для включення в одну з композицій таблетки для подальшого вивчення.

5.2 Вивчення антимікробної активності діючих речовин таблетки

Найважливішим етапом досліджень стало вивчення антимікробної активності запропонованих діючих речовин таблетки: бактеріолітичного ензиму лізоциму, антисептика хлоргексидину біглюконату, комплексу Na_2EDTA і їх комбінацій.

Дослідження проводилися на грампозитивних (*Micrococcus spp.*, 4 штаммах *Staphylococcus aureus* колекції ОНУ імені І.І. Мечникова, АТСС), грамнегативних (7 штаммах *Escherichia coli* колекцій ОНУ імені І.І. Мечникова, АТСС, УКМ, ВК, ВЕ, 4 штами *Pseudomonas aeruginosa* колекції ОНУ імені І.І. Мечникова) бактеріях, а також на дріжджоподібних грибах *Candida albicans* (5 штамів колекції ОНУ імені І.І. Мечникова) сумісно з лабораторією мікробіології Науково-технічного інженерного центру проблем водоочистки та водозбереження «Водообробка».

Дані види мікроорганізмів рекомендовані Державною фармакопеею України для визначення антимікробної активності.

Результати проведених досліджень представлені в табл. 5.2 (s - м/о чутливі; і - м/о з проміжною чутливістю; r - м/о резистентні).

Показано, що всі вивчені БАР і їх комбінації (крім Na₂ЕДТА) проявляють антимікробну дію стосовно *Micrococcus spp.*

Лізоцим і хлоргексидину біглюконат мають антимікробну активність по відношенню до двох і трьох штамів *Staphylococcus aureus*, відповідно, тоді як їх комбінація призводить до загибелі всіх досліджуваних штамів мікроорганізмів. До Na₂ЕДТА дані штами були резистентні або малочутливі.

Однак дія комплексоутворювача більшою мірою проявляється по відношенню до грамнегативних бактерій *E. coli*: 3 штами були чутливі до його дії, 2 малочутливі, всього два - резистентні.

Лізоцим і хлоргексидин проявляють антимікробну дію стосовно п'яти штамів *E. coli*, тоді як комбінована дія лізоциму, хлоргексидину і Na₂ЕДТА проявляється по відношенню до всіх шести вивчених штамів мікроорганізмів.

Бактеріолітичний ефект лізоциму проявляється по відношенню до двох штамів грамнегативних бактерій *Pseudomonas aeruginosa*; хлоргексидину біглюконат, а також його комбінація з лізоцимом викликають загибель всіх 4 штамів мікроорганізмів.

Результати проведених досліджень виявили антимікробну дію лізоциму щодо 2 штамів *Candida albicans*, 2 штами були слабо чутливі до ензиму, тоді як додавання комплексу сприяє посиленню дії лізоциму (виявлено загибель 3 штамів грибків).

Хлоргексидин викликає загибель всіх штамів *Candida albicans*, як і в комбінації з лізоцимом, лізоцимом і комплексом Na₂ЕДТА.

Таким чином, встановлена антимікробна дія лізоциму, яка проявляється в різному ступені, в залежності від роду і штаму мікроорганізму; показано, що додавання хлоргексидину біглюконату у всіх випадках (щодо грамнегативних,

грампозитивних бактерій і дріжджоподібних грибків) сприяє розширенню спектра антимікробної дії ферменту; введення комплексону в дану композицію БАР більшою мірою проявляється по відношенню до грамнегативних бактерій *E. coli* і дріжджоподібних грибків *Candida albicans*.

Таблица 5.2.

Чутливість мікроорганізмів до лізоциму та інших компонентів таблеткових сумішей

Мікроорганізм	ЛІЗ	БГХГС	ЛІЗ +БГХГС	ЛІЗ +БГХГС + Na ₂ ЕДТА	ЛІЗ + Na ₂ ЕДТА	Na ₂ ЕДТА	Na ₂ ЕДТА +БГХГС
E.coli OHY 13	s	s	s	s	s	s	s
E.coli OHY 174	s	i	s	s	s	r	s
E.coli OHY 90 (УКМ В-906)	s	s	s	s	s	s	s
E.coli OHY 447 (ATCC 25922)	s	s	s	s	s	i	i
E.coli OHY 448 (C 600)	s	s	s	s	i	r	s
E.coli OHY 449 (BK)	s	s	s	s	s	i	s
E.coli OHY 450 (BE)	i	s	s	s	r	s	s
S. aureus OHY 443 (ATCC 6538)	s	r	s	s	s	r	r
S. aureus OHY 445	s	s	s	s	s	i	s
S. aureus OHY 223	r	s	s	s	r	r	s
S. aureus OHY 229	i	s	s	s	r	r	s
P.aeruginosa OHY 211	s	s	s	r	i	r	s
P.aeruginosa OHY 446	s	s	s	s	s	r	s
P.aeruginosa OHY 441	r	s	s	r	r	r	s
P.aeruginosa OHY 442	r	s	s	s	i	r	s
C. albicans OHY 425	r	s	s	i	r	r	s
C. albicans OHY 426	s	s	s	s	i	r	s
C. albicans OHY 427	i	s	s	s	s	i	s
C. albicans OHY 428	i	s	s	s	s	r	s
C. albicans OHY 429	s	s	s	s	s	i	s

5.3 Вивчення технологічних характеристик субстанцій і вибір складу допоміжних речовин

Сучасними технологіями таблетування фармацевтичних субстанцій є пряме пресування і таблетування після попереднього вологого гранулювання. Можливість застосування тієї чи іншої технології забезпечується технологічними властивостями основних і допоміжних субстанцій (сипкість, пресування, вологість і ін.), які для більшості порошкоподібних речовин вимагають детального вивчення.

У разі вибору методу таблетування важливу роль відіграє форма і розміри частинок компонентів, найчастіше кристалічних лікарських і допоміжних речовин. Особливо помітний вплив форми і розміру часток субстанцій на технологічні характеристики таблетованої маси, призначеної для прямого пресування. У таблиці 5.3 наведені основні результати мікроскопічного вивчення геометричних і фізичних параметрів субстанцій, що мають важливе значення при виборі технології таблетування.

Таблиця 5.3.

Технологічні характеристики компонентів таблетки

Найменування субстанції	Характеристика
Na ₂ ЕДТА	Пластинчасті, прозорі, безбарвні кристали різної неправильної форми з шорсткою поверхнею.
Лактоза	Об'ємні, пористі кристали з шорсткою поверхнею, різної неправильної геометричної форми.
Маніт	Прозорі, безбарвні, непористі кристали прямокутної витягнутої форми з шорсткою поверхнею.
Ароматизатор	Прозорі, об'ємні кристали прямокутної форми, в основному шаруваті, безбарвні, прозорі, поверхня шарів гладка.

Лізоцим	Великі об'ємні кристали, в основному шаруваті, безбарвні, прозорі, поверхня шарів гладка, прямокутної форми.
Кверцетин	Дуже дрібні голчасті, непрозорі, жовтого кольору кристали, переважно одного розміру.
Хлоргексидину біглюконат	Безбарвні, шорсткі і гладкі, об'ємні і пластинчасті різної форми, кристали.
Na-КМЦ	Кристали подовженої і круглої форми, без гострих кутів, об'ємні, безбарвні з шорсткою поверхнею.
Пласдон К-17	Округлі, об'ємні, пористі, шорсткі, безбарвні кристали, близькі за розмірами.
Кальція цитрат тригідрат	Безбарвні кристали з шорсткою поверхнею, неправильної форми, близькі за розмірами.
Крохмаль	Аморфний зернистий порошок білого кольору.
Желатин	Кристали близькі за розмірами, витягнутої форми, від світло-жовтого до темно-жовтого кольору.

Виходячи з представлених результатів мікроскопічного дослідження, метод прямого пресування не може бути використаний для таблетування. Необхідна попередня обробка субстанцій. З огляду на необхідність отримання іммобілізованої форми лізоциму, неоднорідність і суттєві відмінності в розмірах, формі, поверхні частинок компонентів таблетки, була обрана технологія вологого гранулювання, що забезпечує отримання однорідних гранул з рівномірно розподіленими діючими компонентами і усуває всі перераховані вище технологічні недоліки субстанцій.

Пошук прийнятних композицій для таблетки вели цілеспрямовано: спочатку було обрано дозування діючих речовин, виходячи з рекомендованих

терапевтичних доз, потім наповнювачі, зв'язуючі речовини і дезінтегранти, ароматизатори. У разі незадовільних показників переходили до наступного складу. Результати представлені в таблиці 5.4

Таблиця 5.4.

Склад модельних гранулятів для таблетки з лізоцимом

№	Компонент	Маса компонентів в різних складах, мг								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Лікарські речовини										
1	Лізоцим	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	15,0
2	Кверцетин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,00	3,0	3,0	5,0
3	Хлоргексидину біглюконат	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	5,0
4	Na ₂ ЕДТА	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	-
Наповнювачі										
4	Лактоза	114,9	154,5	149,5	155,5	160,0	164,1	-	-	-
5	Кальцію цитрат тригідрат	-	-	-	-	-	-	210,0	239,3	360,0
Дезінтегранти										
6	Маніт	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	-	-	-
7	Крохмаль	-	-	-	-	-	-	34,5	34,5	-
Смакові добавки										
8	Ароматизатор «Лимон»	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	-	0,6	1,2
9	Сахароза	-	-	-	-	-	-	30,0	-	3,0
Зв'язуючі										
10	Натрієва сіль карбоксиметилцелюлози*	-	-	15	9	4,5	0,4	-	-	
11	Повідон К-17**	50	10	-	-	-	-	-	-	
12	Желатин	-	-							210,0
Змашувальні										
13	Кальцію стеарат	-	-	-	-	-	-	4,5	4,5	0,8
Всього		200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	300,0	300,0	600,0

* Як зв'язуючу речовину використовували ПВП у вигляді 5% водного розчину (№ 1, 2), NaКМЦ у вигляді 0,1% розчину (№ 3, 4); 1,5% (№ 5); 3,0% (№ 6) крохмаль (№ 7 і 8) або желатин (№9).

В результаті отримані гранули жовтого кольору, без видимих сторонніх включень наступного вигляду (рис. 5.6-5.9):

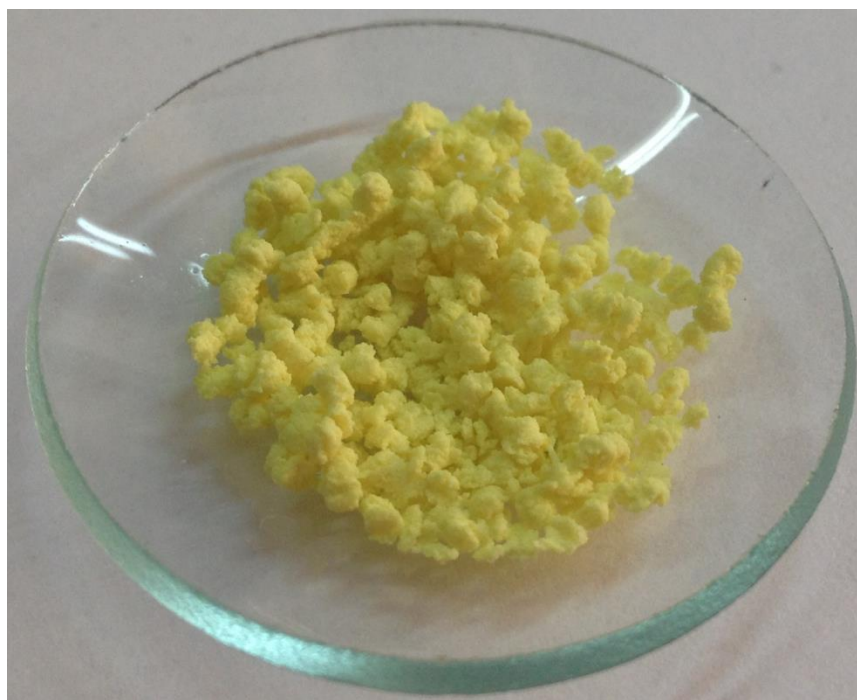


Рис. 5.1. Гранулят з лізоцимом з використанням ПВП ($d = 1,5$ мм)



Рис. 5.2. Гранулят з лізоцимом з використанням NaКМЦ ($d = 1,5$ мм)

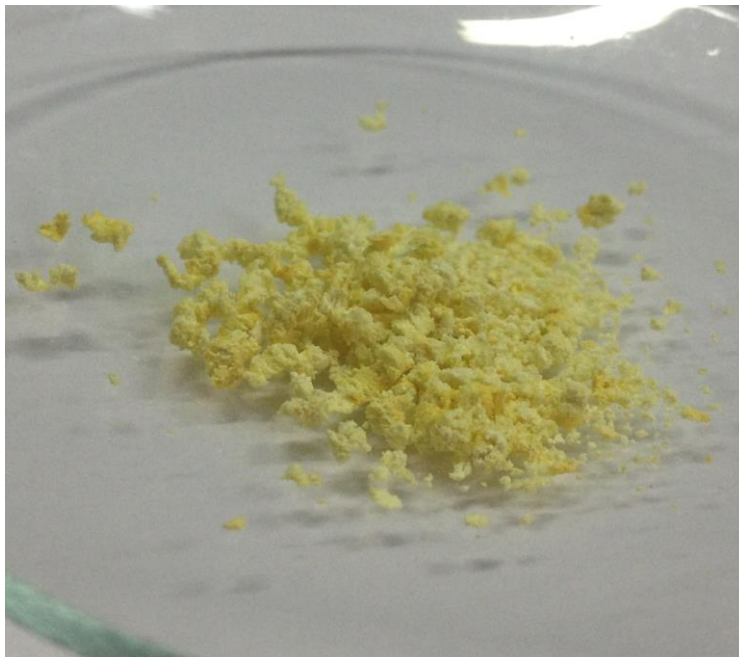


Рис. 5.3. Гранулят з лізоцимом з використанням крохмалю ($d = 1,5$ мм)



Рис. 5.4. Гранулят з лізоцимом з використанням желатину ($d = 1,5$ мм)

Концентрація полімерів і їх кількість при вологій грануляції впливають на час розчинення гранул (табл. 5.5). Виходячи з отриманих результатів видно, що час розчинення гранул можна варіювати шляхом зміни зв'язуючих полімерів і їх кількості при гранулюванні. Так, при використанні Na-КМЦ в кількості 4,5 -9 мг і більше, гранулят не розчиняється, що унеможливило застосування полімеру в зазначеній кількості.

Таблиця 5.5.

Час розчинення гранул, отриманих з різними полімерами

№ п/п	Полімер	Час розчинення гранул у воді *, хв	
		без лізоциму	з лізоцимом
1	ПВП		
2	50 мг	30±0,10	30±0,15
	10 мг	3±0,015	3±0,01
3	Na-КМЦ		
4	9 мг	25±0,15	н.р.
5	4,5 мг	15±0,10	н.р.
6	0,4 мг	5±0,01	30±0,12
	0,2 мг	1±0,01	5±0,01
7,8	Крохмаль		
	34,5 мг	0,5±0,01	0,5±0,01
9	Желатин		
	210 мг	20±0,1	22±0,1

* Умови: 10 см³ дистильованої води, без перемішування при 20 °С, при n=5

Гранули, отримані на основі цитрату кальцію з додаванням крохмалю більш тендітні, руйнуються, при цьому цитрат кальцію як нерозчинна сполука і кверцетин залишаються в осаді. Слід зазначити також, що наявність ферменту не впливає на час руйнування грануляту в водному розчині. У всіх отриманих гранулятах визначали вміст лізоциму і кверцетину (табл. 5.6).

Таблиця 5.6.

Вміст лізоциму і кверцетину в грануляті

№ п/п*	Гідролітична активність лізоциму		Вміст кверцетину	
	од/мг (M±m)	% від внесеного	мкг в 5 мг грануляту (M±m)	% від внесеного
1	19320±1160	96,60	45,67±2,28	97,55
2	19253±1116	96,27	45,14±2,26	94,6
3	17365±868	86,82	не вдалося визначити через нерозчинність гранул	—
4	18145±1160	90,73	не вдалося визначити через нерозчинність гранул	—
5	19160±958	95,80	46,26±2,31	96,90

Продовження табл. 5.6

6	19227±961	96,14	45,58±2,28	95,48
7	19535±910	97,67	47,80±3,27	95,60
8	19115±940	95,58	48,75±5,80	97,50
9	19290±975	99,85	44,95±2,0	98,42

* № грануляту відповідає № складу в табл. 5.4. при $n=5$

Отримані результати свідчать про високе збереження активності і вміст кверцетину в гранулятах № 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9.

Для подальших досліджень обрали чотири зразки, № 2, № 6 та № 7, № 9. Вирішальним фактором був час розчинення гранул, який додатково збільшиться після стадії таблетування.

Як препарати порівняння використовували «Лісобакт» і «Лізак», для яких час розпадання при температурі 37 ° С в однакових умовах відрізнявся: $5 \pm 0,5$ хв для препарату «Лісобакт» і $8 \pm 0,5$ хв для препарату «Лізак».

На основі проведених досліджень з вивчення взаємодії полімерів з лізоцимом (п. 4.1) і збереженню активності і основних біохімічних властивостей ензиму, обрана полімерна матриця желатин / Na-КМЦ для створення таблетованої форми ензиму. Визначено, що обрані діючі і допоміжні компоненти не впливають на бактеріолітичну активність лізоциму. Вивчено антимікробну дію лізоциму, яка проявляється в різному ступені і залежить від роду і штаму мікроорганізмів. Показано, що додавання хлоргексидину біглюконату в усіх випадках (щодо грамнегативних, грампозитивних бактерій і дріжджоподібних грибків) сприяє розширенню спектра дії. Слід зазначити, що введення комплексу Na_2EDTA в дану композицію БАР більшою мірою проявляється по відношенню до грамнегативних бактерій *E. coli* і дріжджоподібних грибків *Candida albicans* і не є суттєвим при наявності хлоргексидину біглюконату. Також обґрунтований вибір технології вологого гранулювання для отримання таблетованої маси з іммобілізованим лізоцимом, отримані грануляти різних складів і вивчені їх фізико-хімічні та біохімічні властивості.

5.4 Розробка методів аналізу компонентів таблеткових сумішей

Розробляючи технологію отримання таблеткових сумішей, особливо приділяли увагу розробці методів кількісного аналізу їх компонентів. Слід зазначити, що препарат має багатокomпонентний склад, і визначення всіх діючих речовин у присутності інших представляє непросте завдання.

Лізоцим є основним діючим компонентом таблетки, його кількісне визначення полягало в аналізі білка і активності в таблетній суміші. Вміст білка контролювали методом Лоурі-Хартрі (п. 2.1), гідролітичну активність визначали з використанням як субстрату *Micrococcus lysodeikticus* згідно п. 2.2. Результати визначення представлені в табл. 5.7

Виходячи з отриманих даних видно, що кількісне визначення лізоциму в таблетній суміші не представляє складності, за винятком гранулятів № 3 і № 4, в яких високий вміст натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (15 і 9 мг, відповідно) призвів до надмірно високої міцності гранул і їх низької розчинності, через що лізоцим не вивільняється.

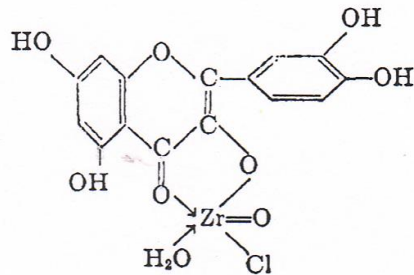
Таблиця 5.7.

Визначення лізоциму в грануляті

№ досліджуваного гранулята	Вміст білка, мг		Гідролітична активність, од/мг ферменту	
	Внесено	Знайдено*	Вихідна	В препараті**
1	10	9,977±0,49	20000	19000±870
2				
3		-		-
4				
5		9,983±0,09		18500±850
6				
7		9,998±0,24		19300±980
8				
9	15	-	20000	19750±920

*при n=5 p<0,001; **при n=5 p<0,001

Високою специфічністю характеризується метод визначення кверцетину з хлорокисом цирконію (п. 2.2.9), в результаті реакції утворюється інтенсивно забарвлений комплекс сполук з максимумом поглинання 468 нм, структурна формула якого представлена нижче [246].



У таблиці 5.8 наведені результати аналізу вмісту кверцетину в гранулятах різного складу, відповідно таким у табл. 5.4. Слід зазначити, що у всіх випадках кверцетин визначається кількісно, за винятком складів № 3, 4.

Таблиця 5.8.

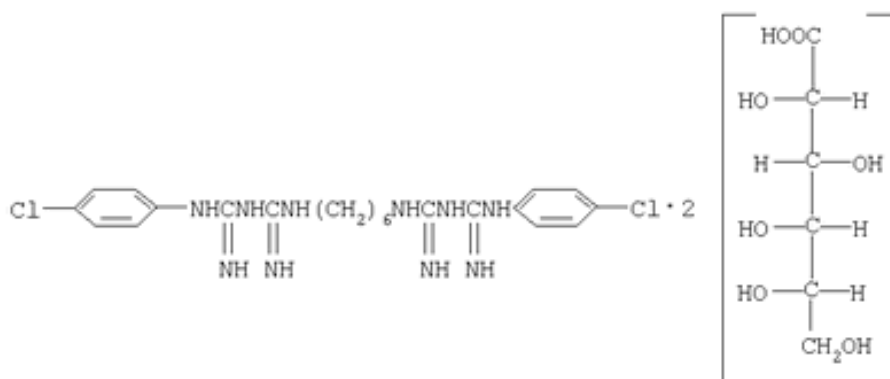
Визначення кверцетину в гранулятах

№ досліджуваного грануляту	Вміст кверцетину, мг	
	Внесено	Знайдено*
1	2	1,934±0,79
2		
3		-
4		
5		1,964±0,11
6		
7	3	2,970±0,14
8		
9	5	4,698±0,15

*при n=5 p<0,001

Хлоргексидин - лікарський препарат, антисептик, в готових лікарських формах використовується у вигляді біглюконату (*Chlorhexidini bigluconas*). Для

визначення хлогексидину біглюконату застосовуються різні методи, як титриметричні (неводне титрування), так і спектрофотометричні та хроматографічні. Структура хлогексидину біглюконату представлена нижче:



Застосування методики спектрофотометричного визначення хлогексидину, описаної в п. 2.10, призвело до незадовільних результатів.

Виходячи з даних, наведених в таблицях 5.9 - 5.11, хлогексидину біглюконат кількісно визначається за відсутності інших компонентів з високим ступенем достовірності. Однак у складах гранулятів № 1-4 супутні компоненти достовірно впливають на його визначення. Так, лізоцим дозволяє визначити 80,22% аналізованої сполуки, кверцетин - 90,52%, маніт - 89,82%, лактоза всього лише 30,87% і полівінілпіролідон - 91,34%. Найбільш відчутним є вплив лактози.

Таблиця 5.9.

Вплив компонентів гранулятів складів №1-4 на визначення біглюконату хлогексидину *

№ п/п	Сполука	Вміст		Мольне відношення сполука/ХГБГ
		Внесено сполуки	Знайдено ХГБГ, мкг (%)	
1	ХГБГ за відсутності інших компонентів	200 мкг	195,05±3,74 мкг (100%) P*<0,001	--
2	Лізоцим	1 мг	155,46±3,54 (80,22%) P*<0,001 P**<0,001	3,218·10 ⁻⁴ /1

Продовження табл. 5.9

3	Кверцетин	1,94 мкг	176,56±5,64 (90,52%) P* < 0,001 0,02 < P** < 0,01	2,956·10 ⁻² /1
4	Na ₂ ЕДТА·2H ₂ O	300 мкг	183,66 (94,16%) P* < 0,001 0,02 < P** < 0,01	3,711/1
5	Маніт	1,785 мг	175,19 (89,82%) P* < 0,001 0,001 < P** < 0,002	45,092/1
6	Лактоза·H ₂ O	17,5 мг	60,22 (30,87%) P* < 0,001 P** < 0,001	217,99/1
7	Ароматизатор	63 мкг	192,09 (98,48%) P* < 0,001 P** > 0,1	--
8	ПВП	30 мкг	178,15 (91,34%) 0,001 < P* < 0,002 0,05 < P** < 0,1	7,92·10 ⁻³ /1
9	Na-КМЦ	9 мкг	192,36 (98,62%) P* < 0,001 P** > 0,1	--

P* - достовірність відмінностей при n = 3

P ** - достовірність відмінностей між визначеннями ХГБГ за відсутності потенційно заважаючих речовин і в їх присутності

Таблиця 5.10.

Вплив компонентів грануляту складів № 7-9 на визначення біглюконату хлоргексидину *

№ п/п	Сполука	Вміст		Мольне відношення сполука/ХГБГ
		Внесено сполуки	Знайдено ХГБГ, мкг (%)	
1	ХГБГ за відсутності інших компонентів	200 мкг	194,65±1,69 мкг (100%) P* < 0,001	--

2	Кверцетин	0,838 мкг	190,64±0,897 (97,94%) P* < 0,001 0,02 < P** < 0,01	0,0124/1
4	Цитрат Са тетрагідрат, насичений розчин	476 мкг в розрахунку на безводний	196,19±4,718 (100,79%) P* < 0,001 P** > 0,1	4,286/1
4	Цитрат Са тетрагідрат, твердий	14 мг тетрагідрату	103,15±6,96 (52,99%) 0,001 < P* < 0,002 P** < 0,001	110,141/1
5	Крохмаль картопляний	2,0 мг	195,46 ± 2,517 (100,42%) P* < 0,001 P** > 0,1	-
6	Сахароза	2,0 мг	79,75 ± 6,692 (40,97%) 0,001 < P* < 0,002 P** < 0,001	217,99/1

*P ** - достовірність відмінностей при $n = 3$

*P *** - достовірність відмінностей між визначеннями ХГБГ за відсутності потенційно заважаючих речовин і в їх присутності

Незважаючи на те, що лактоза є широко використовуваним в таблетованих формах наповнювачем, її індіферентність виявляється досить відносною, що виявилось в процесі дослідження. Виходячи з даних літератури [247], ця допоміжна речовина може вступати в різного роду взаємодії, як з іншими допоміжними речовинами ліків, так і з діючими інгредієнтами. Наслідком подібного виду взаємодій може бути зміна активності лікарської речовини, аж до повної її інактивації, зміна процесів її всмоктування або, як в досліджуваному нами випадку, складність кількісного спектрофотометричного визначення.

Таблиця 5.11.

Вплив сахарози на визначення біглюконату хлоргексидину *

№ п/п	Сполука	Вміст		Мольне відношення сполука / ХГБГ
		Внесено сполуки	Знайдено ХГБГ, мкг (%)	
1	ХГБГ за відсутності інших компонентів	200 мкг	195,69±1,116 мкг (100%) P*<0,001	--
2	Таблеткова маса без сахарози	-	153,54±2,626 (78,46%) P*<0,001 P***<0,001	-
3	Таблеткова маса з сахарозою	-	72,60±5,531 (37,10%) 0,001<P*<0,002 P***<0,001	-

*P ** - достовірність відмінностей при $n = 5$ *P *** - достовірність відмінностей між визначеннями ХГБГ за відсутності потенційно заважаючих речовин і в їх присутності

Визначення хлоргексидину біглюконату хроматомас-спектрометричним методом проводили в зразку грануляту № 6. Дослідження проводилося в комбінованій системі ВЕРХ-МС - рідинний хроматограф 1260 Infinity з діод-матричним детектором і детектором 6530 Accurate Mass Q-TOF (Agilent Technologies, США).

Визначення хлоргексидину біглюконату проводили в наступних умовах:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 100 мм × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром частинок 3,5 мкм;

- рухома фаза: ацетонітрил - метанол - амонійно-форміатний буферний розчин з рН = 4,0 (35:20:45 об/об);
- швидкість елюювання 0.500 см³/хв;
- температура колонки 35° С;
- об'єм інжекції 0,01 см³;
- час проведення аналізу:

для градуювальних розчинів 5 хв;

для досліджуваних розчинів 25 хв;

- детектування:

за іонним струмом

- спосіб іонізації - подвійний електроспрей при атмосферному тиску;
- температура газоносія – 350° С;
- енергія фрагментації – 200 В;
- тиск розпилювача – 45 psiq;
- напруга на капіляри – 4500 В.

спектрофотометричне

- реєстрація сигналу при довжині хвилі 260.0 нм.

На рисунках 5.5 і 5.6 представлені електронний спектр поглинання і мас-спектр піки хлоргексидину біглюконату. В УФ-спектрі спостерігається два максимуми, при 200 нм і 260 нм.

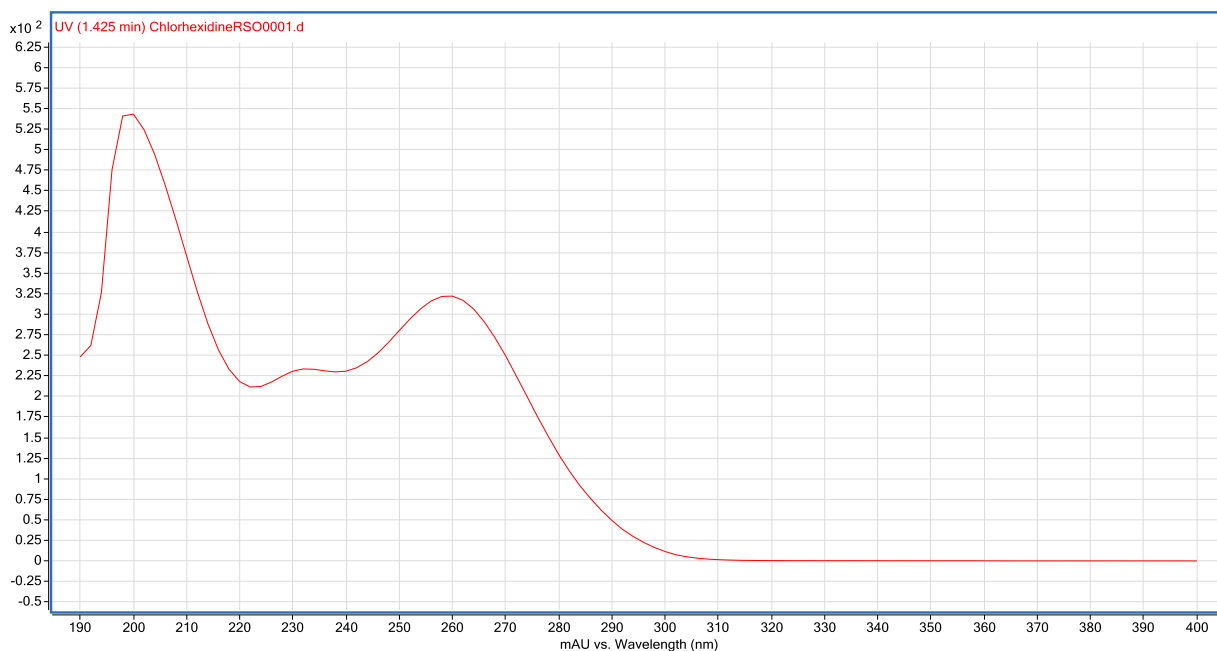


Рис. 5.5. УФ спектр піку хлоргексидину біглюконату.

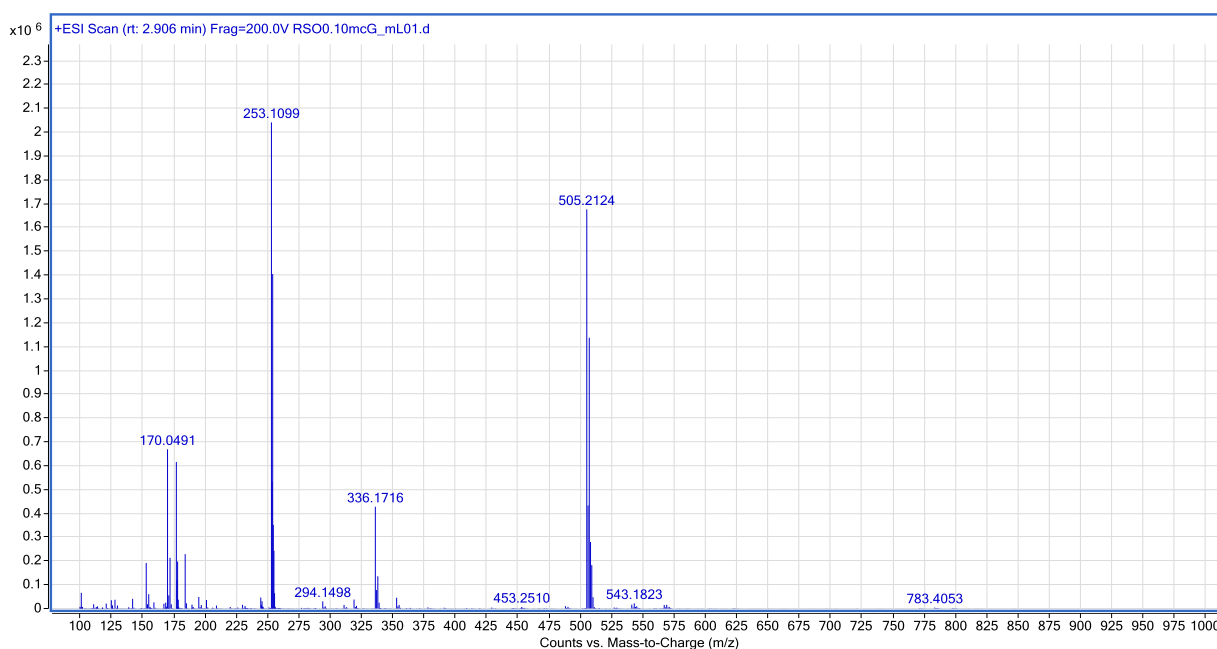


Рис. 5.6. Мас-спектр піку хлоргексидину.

У мас-спектрі спостерігаються пік протонованого молекулярного іона хлоргексидину ($M^+ H^+$) = 505.2124 m / z, що відповідає даним літератури, а також піки осколкових іонів.

На наступному етапі дослідження будували градувальні графіки. Для цього в мірні колби місткістю 25,0 см³ вносили по 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 і 1,50

см³ 0,05% розчину хлоргексидину біглюконату, доводили водою до мітки і перемішували. Отримані розчини хроматографували в зазначених вище умовах, отримуючи результати по трьох паралельних інжекціях (рис. 5.7).

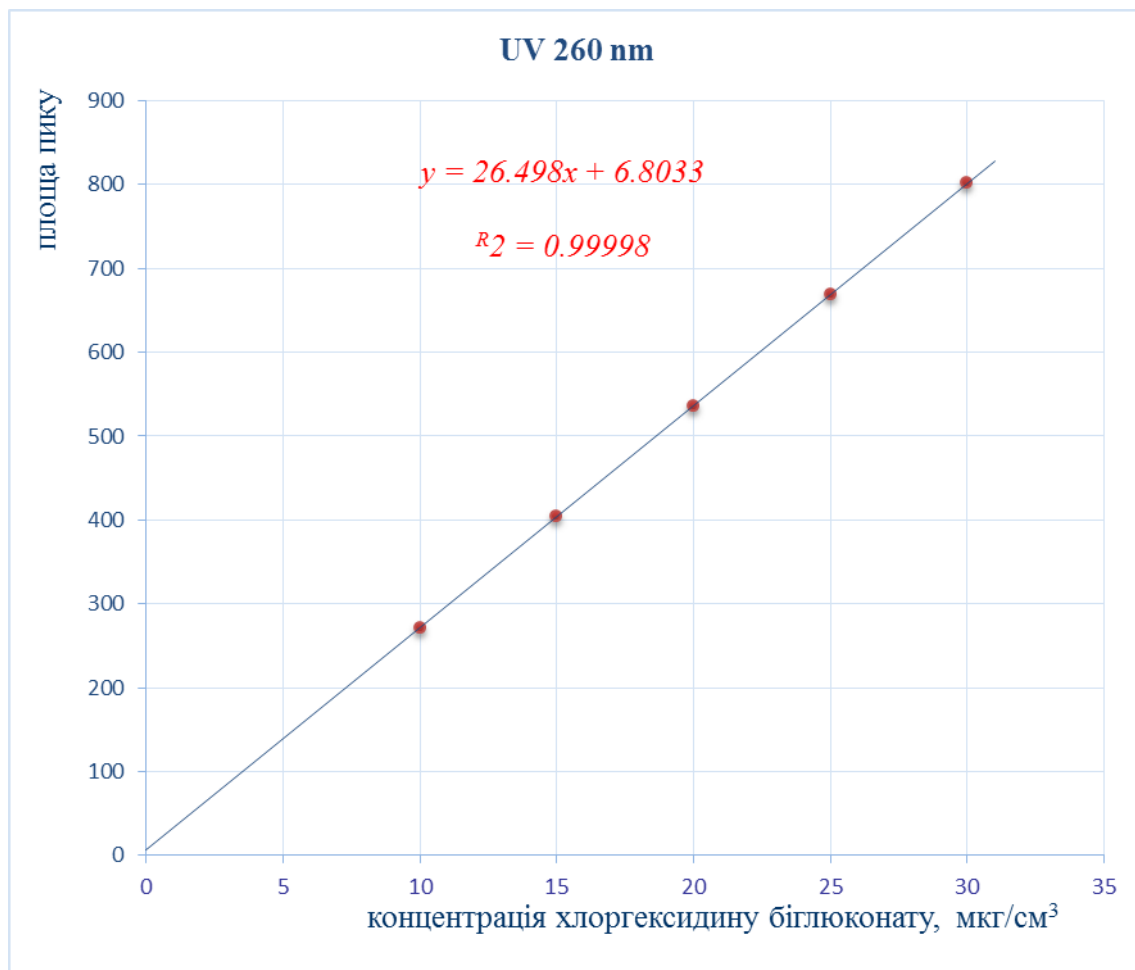
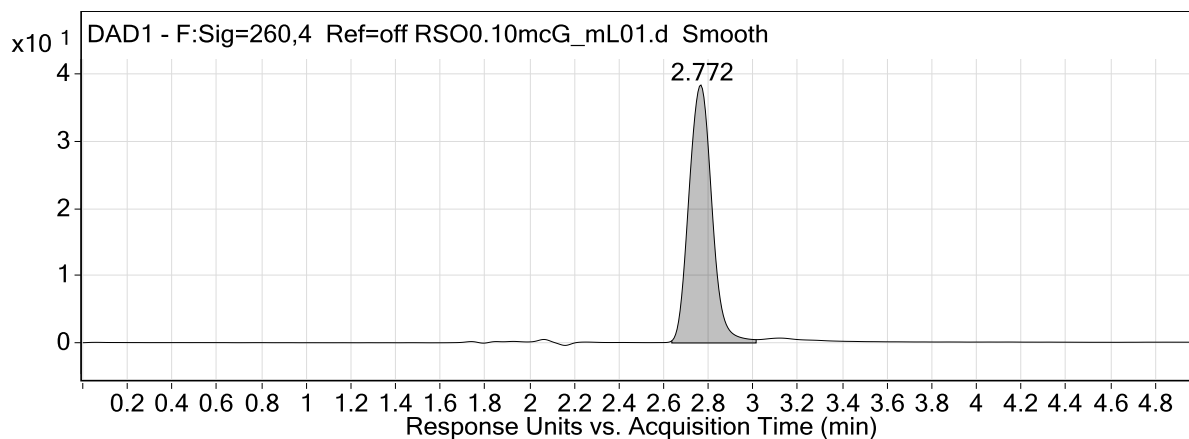


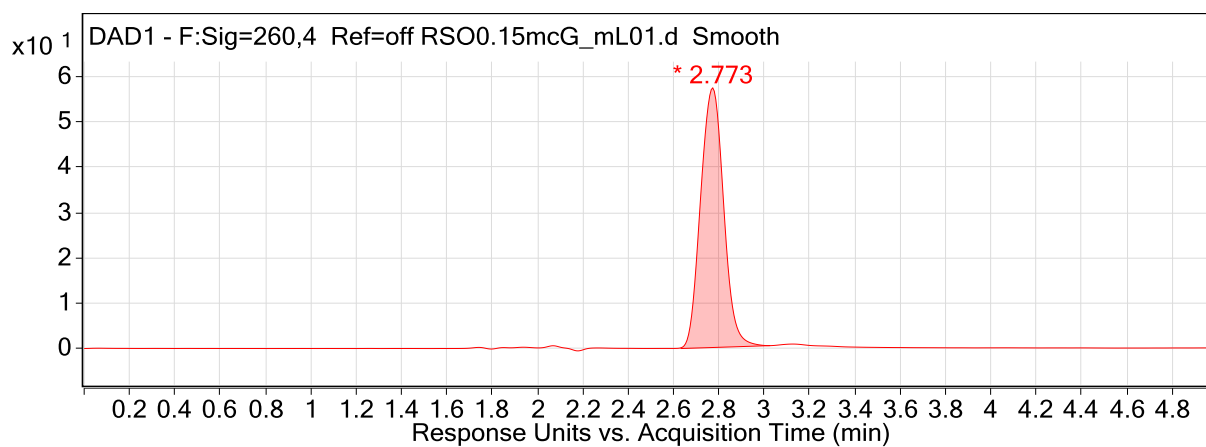
Рис. 5.7. Градувальний графік залежності площі піка хлоргексидину від концентрації при довжині хвилі 260 нм.

Хроматограми відповідних градувальних розчинів наведені на рис. 5.8.



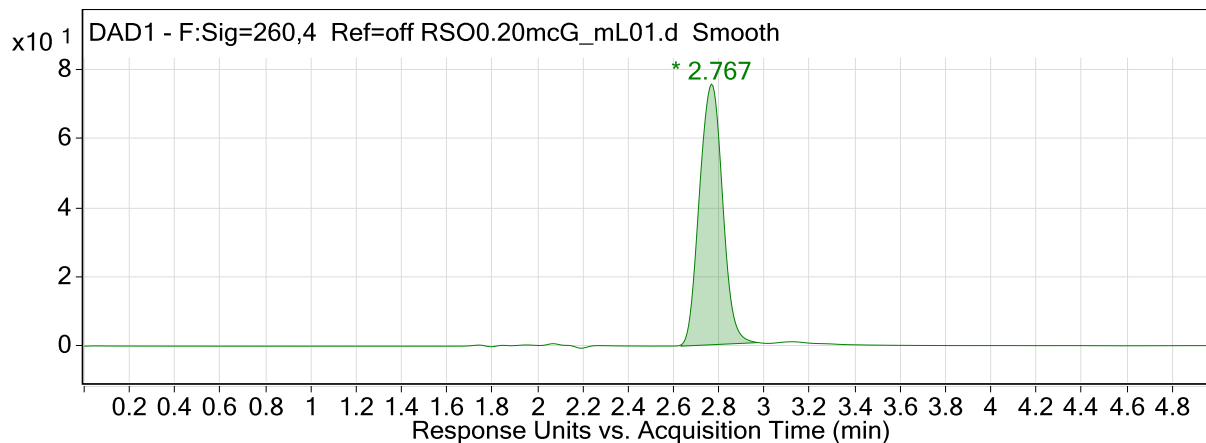
Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	2.636	2.772	3.014	38.17	272.89	100



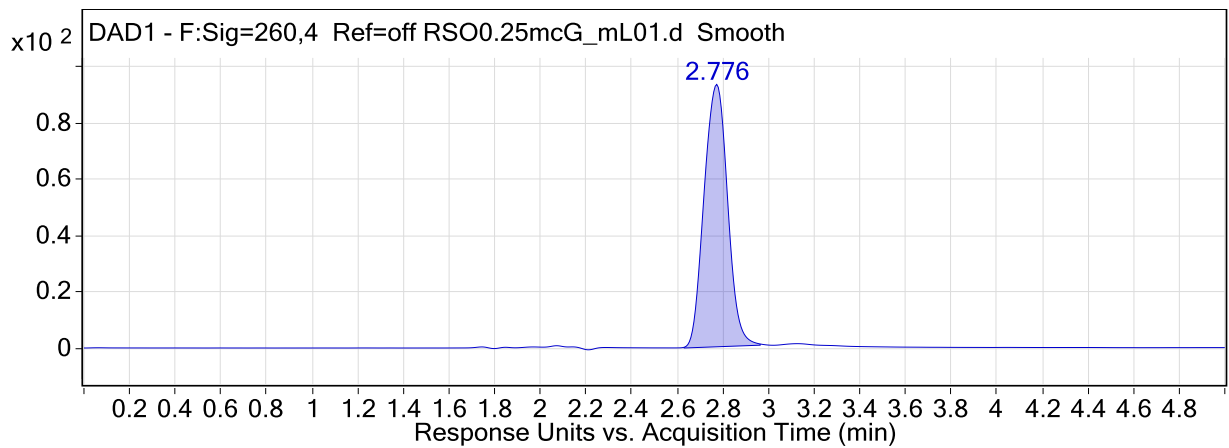
Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	2.633	2.773	3.027	57.27	404.94	100



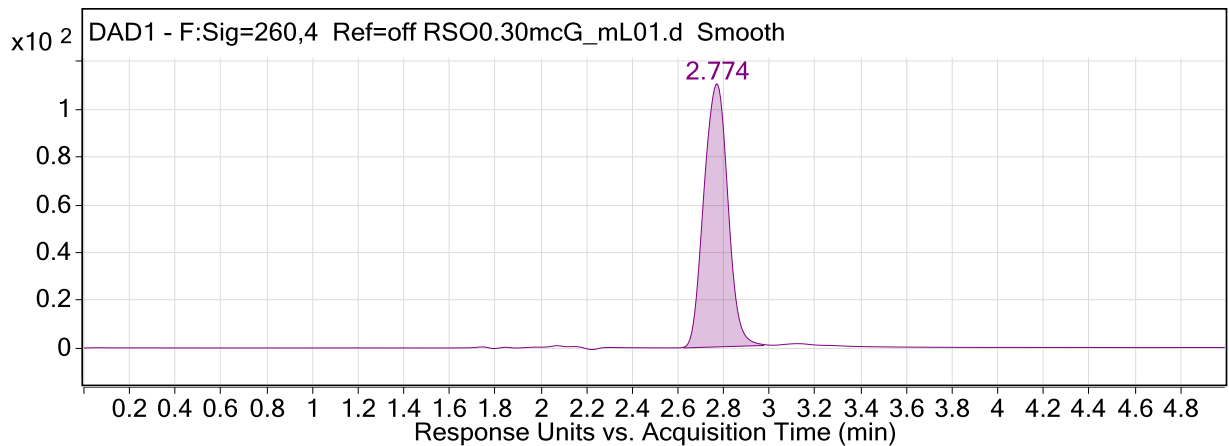
Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	2.633	2.767	2.973	75.25	534.78	100



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	2.631	2.776	2.964	93.15	667.17	100



Integration Peak List

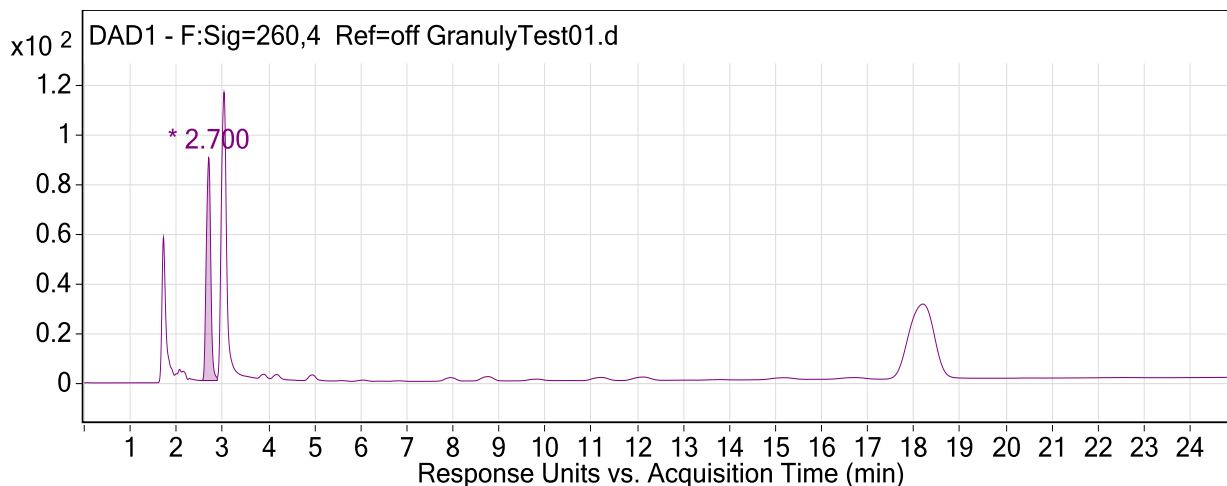
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	2.625	2.774	2.975	110.72	804.2	100

Рис. 5.8. Хроматограми градувальних розчинів.

Для аналізу досліджуваних розчинів наважки препарату (58,87; 61,71 мг) вносили в мірну колбу, місткістю 10,0 см³, додавали 6 см³ води і ставили в УЗ-баню на 2 хв. Потім доводили водою до мітки, перемішували і фільтрували через шприцевий мембранний фільтр ПТБЕ 0,45 мкм, відкидаючи перші 2 см³ фільтрату. Хроматографували в умовах, зазначених вище.

При перших випробуваннях бралися наважки з розрахунку, що в препараті міститься 1 % аналізуємої сполуки. Однак при цьому отримували значення площі піка хлоргексидину, що виходять за нижню точку градувального графіка. При наступних випробуваннях наважки брали з таким

розрахунком, щоб значення площі піка хлоргексидину перебували в градувальному інтервалі. Хроматограма і мас-спектр хлоргексидину в уже згадуваному грануляті представлені на рис. 5.9, 5.10.



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	2.547	2.7	2.887	89.9	605.1	100

Рис. 5.9. Хроматограма випробуваного розчину.

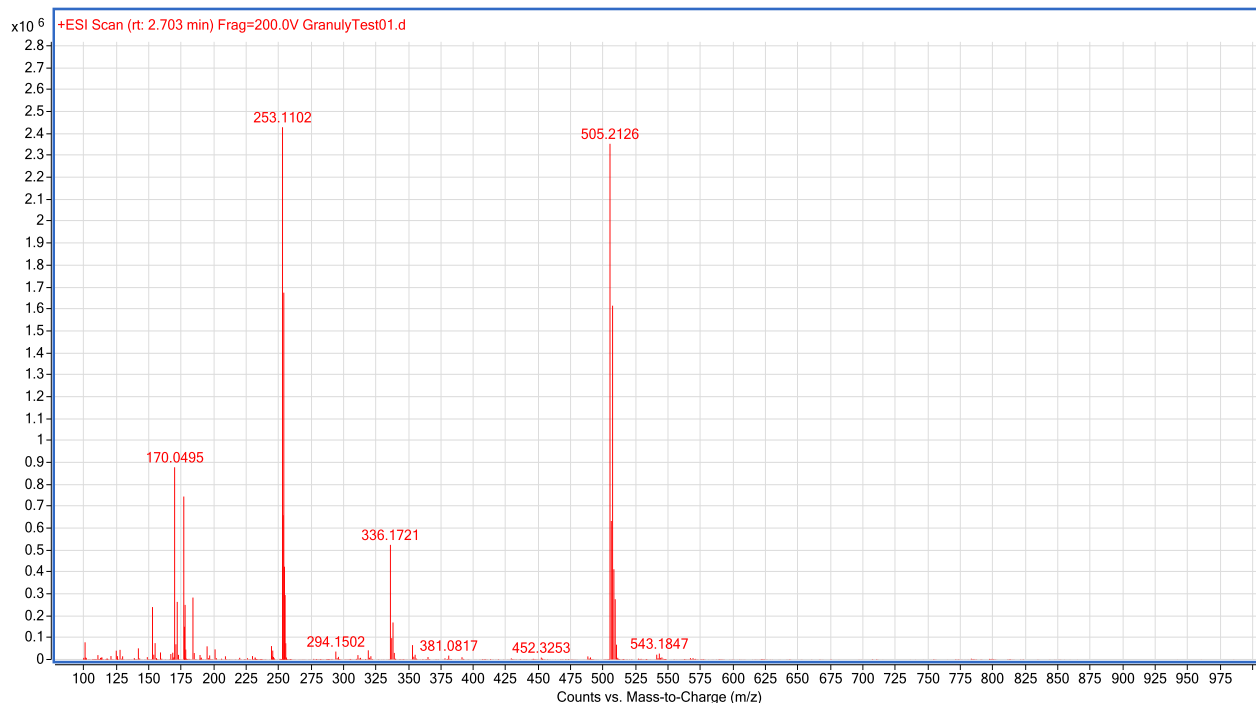


Рис. 5.10. Мас-спектр аналітичного піка з RT = 2.7 хв на хроматограмі випробуваного розчину.

У таблиці 5.12 представлені результати визначення вмісту хлоргексидину біглюконату в грануляті складу № 6.

Таблиця 5.12.

Результати визначення вмісту хлоргексидину біглюконату в 1000 мг грануляту № 6

Маса наважки, мг	Площа піка	Вміст, мг на 1000 мг	Середнє значення, мг/1000 мг	Середнє значення, мг/1000 мг	Вміст від внес., %
58,87	605,10	3,84	3,82±0,36 <i>P</i> <0,05	3,82	38,2
	600,79	3,81			
	602,52	3,82			
61,71	631,62	3,82	3,82±0,14 <i>P</i> <0,05		
	631,63	3,82			
	630,15	3,81			

Специфічність даної методики аналізу доведено поділом хроматографічних зон і ідентифікацією зони аналізованого компонента за допомогою мас-спектра.

Отримані результати хроматомас-спектрометрії добре узгоджуються з результатами спектрофотометричного аналізу: хлоргексидину біглюконат визначається на 38,2 і 30,9%, відповідно, що підтверджує наявність міжмолекулярних взаємодій діючих компонентів. У зв'язку з цим на даному етапі досліджень кількісне визначення хлоргексидину біглюконату у таблетованій суміші є неможливим.

Таким чином, в результаті проведених досліджень визначені методи кількісного аналізу діючих компонентів таблетної суміші: лізоциму і кверцетину. Грануляти з використанням запропонованих чотирьох композицій наповнювачів, а саме лактози моногідрату, маніту, повідону К-17; лактози моногідрату, маніту, карамелози; цитрату кальцію, крохмалю; цитрату кальцію, желатину зберігають свої фізичні, хімічні і механічні властивості

протягом 12 місяців в герметично упакованому стані. З огляду на наявність у чинній композиції ензиму, рекомендується зберігати препарат при температурі 0-4 ° С.

Разом з тим процес розробки нового багатокомпонентного лікарського препарату передбачає виявлення різного роду фармацевтичних взаємодій, в тому числі таких, що заважають кількісному визначенню діючих речовин. Виходячи з отриманих результатів, що виявили наявність взаємодій хлоргексидину біглюконату з лізоцимом, кверцетином, манітом, полівінілпіролідом і лактозою, хлоргексидину біглюконат був виключений з числа діючих компонентів препарату.

5.5 Дослідження дії таблетної суміші з іммобілізованим лізоцимом, на тканини порожнини рота щурів після аплікації гелю ліпополісахариду

Одним з основних бактеріальних ендотоксинів, що характеризуються вираженими антигенними властивостями і широко застосовується в моделюванні запальних реакцій, є ліпополісахарид (рис. 5.13). Токсин є компонентом клітинної стінки грамнегативних бактерій, який структурно складається з трьох основних частин:

- ліпід А - дисахарид з декількома сполученими ланцюгами гідроксиміристинової кислоти, який сприяє закріпленню молекули ЛПС в бактеріальній мембрані;
- Кор - ядро ліпополісахариду (олігосахарид, що складається з кетодезоксиоктулозонату і гептози);
- О-антиген - полісахаридні ланцюги, унікальні для кожної бактерії.

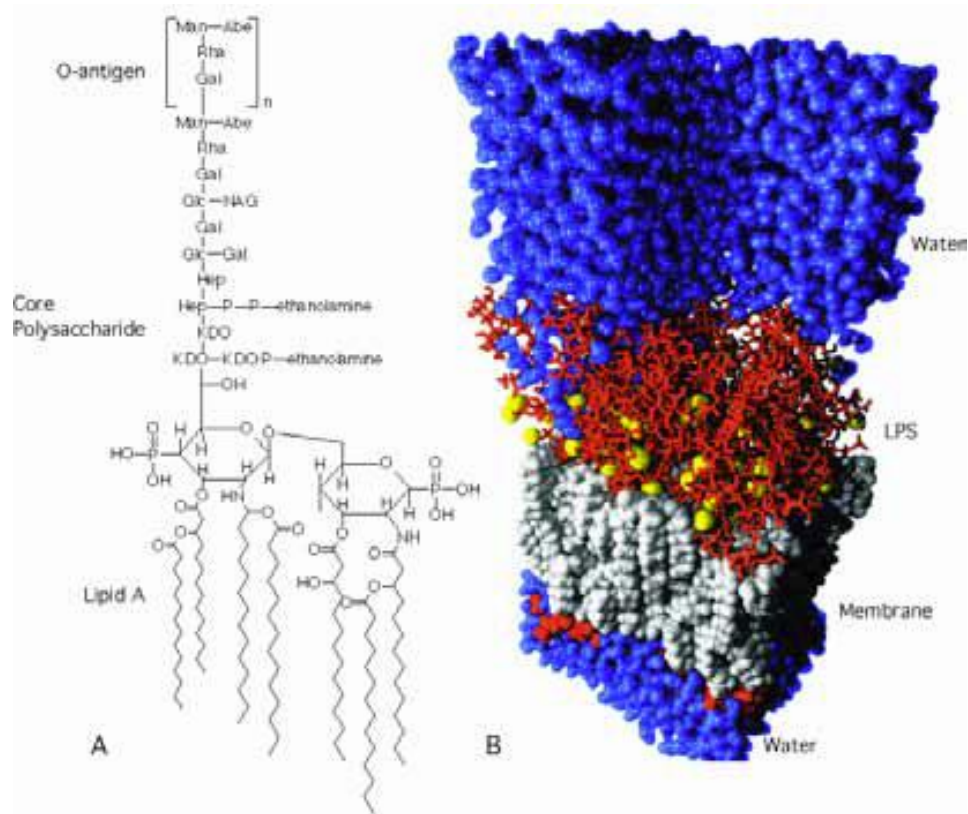


Рис. 5.11. Структура ендотоксину грамнегативної бактерії [248, 249].

У біологічних експериментах, що виконувались сумісно з чл.-кор. НААНУ, проф., д.м.н. А.П. Левицьким, зав. лабораторією біохімії ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН», д.б.н., с.н.с. О.А. Макаренко, оцінювали лікувально-профілактичну дію досліджуваних таблетованих композицій з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином. Детально методика експерименту описана в п. 2.30.

Для введення тваринам використовували гель ліпополісахариду з *E. coli* 0127-B8 («Sigma», Ізраїль) на 4 % Na-КМЦ. Цей гель з концентрацією ЛПС 200 мкг/см³ використовували для відтворення стоматиту і гінгівіту згідно [249-251].

Досліджуваними зразками були:

- композиція лізоцим + кверцетин, що містить лізоциму 50 мг/г, кверцетину 10 мг/г, ЕДТА 15 мг/г і хлоргексидину біглюконат 10 мг/г;
- композиція лізоциму з желатином, що містить 0,2 мг лізоциму і 2 мг желатину в 1 таблетці.

Як препарат порівняння використовували «Лізак» виробництва ПАТ «Фармак» (Україна) у вигляді таблеток, що містять 10 мг лізоциму гідрохлориду і 0,25 мг антисептика деквалінію хлориду. Препарати лізоциму вводили в 4% гелі Na-КМЦ в концентрації 1 мг / см³ (в перерахунку на чистий лізоцим) (табл. 5.13) для закріплення на слизовій експериментальних тварин.

Таблиця 5.13.

Характеристика лізоцимвмісних сумішей

Гель	Діюча сполука	Допоміжні речовини	Гель-концентрація діючої сполуки
Лізак	лізоцим	деквалінію хлорид	1 мг/см ³
Лізоцим+кверцетин	лізоцим, кверцетин	хлоргексидин, ЕДТА	лізоцим 1 мг/см ³ , кверцетин 0,2 мг/см ³
Лізоцим+желатин	лізоцим	желатин, бензоат Na	лізоцим 1 мг/см ³

У таблиці 5.14 представлені результати визначення активності лізоциму в тканинах щурів, які отримували лізоцимвмісні гелі та аплікації ЛПС.

Таблиця 5.14.

Вплив таблеткових сумішей на активність лізоциму в сироватці крові і в слизовій порожнини рота щурів після дії ЛПС

№ п/п	Група	Лізоцим, М±m		
		Сироватка, од/дм ³	Щока, од/кг	Ясна, од/кг
1	Інтактна	95 ± 9	163 ± 17	161 ± 5
2	ЛПС	65 ± 4 p < 0,05	137 ± 16 p > 0,2	142 ± 7 p < 0,05
3	ЛПС+ «Лізак», (1 мг/кг)	78 ± 4 p < 0,05; p ₁ > 0,05	160 ± 8 p > 0,7; p ₁ > 0,05	184 ± 8 p < 0,05; p ₁ < 0,05
4	ЛПС+ Лізоцим+кверцетин (1 мг/кг і 0,2 мг/кг)	88 ± 5 p > 0,3; p ₁ < 0,05	308 ± 18 p < 0,001; p ₁ < 0,001	167 ± 15 p > 0,3; p ₁ > 0,05
5	ЛПС+ лізоцим (1 мг/кг) + желатин (10 мг/кг)	79 ± 6 p > 0,05; p ₁ < 0,05	341 ± 33 p < 0,01; p ₁ < 0,01	161 ± 13 p = 1; p ₁ > 0,05

Примітки: p - в порівнянні з гр. 1; p₁ - в порівнянні з гр. 2.

З цих даних випливає, що ЛПС достовірно знижує в сироватці активність лізоциму, тоді як попереднє введення препаратів лізоциму її збільшує, причому найбільшою мірою - поєднання лізоциму з кверцетином. Аплікації ЛПС знижують активність лізоциму не тільки в сироватці крові, а й в слизовій порожнини рота. Попередні аплікації препаратів лізоциму підвищують активність ензиму, особливо в щоці, причому найбільшою мірою це здійснюють лізоцим в композиції з желатином і комбінація лізоциму з кверцетином.

У таблиці 5.15 показано зміну активності уреазу в тканинах щурів після аплікації ЛПС. Достовірні зміни цього показника не спостерігаються. Попередні аплікації препаратів лізоциму мало впливають на активність уреазу в сироватці і в слизовій щоці, проте виявляють тенденцію до підвищення в яснах.

Таблиця 5.15.

Вплив лізоцимвмісних сумішей на активність уреазу в тканинах щурів після аплікацій ЛПС

№ п/п	Група	Уреаза		
		Сироватка, нкат/дм ³	Щока, мк- кат/кг	Ясна, мк- кат/кг
1	Інтактна	3,43 ± 0,53	0,45 ± 0,06	0,39 ± 0,06
2	ЛПС	2,70 ± 0,62 p > 0,3	0,49 ± 0,11 p > 0,3	0,34 ± 0,06 p > 0,3
3	ЛПС+ «Лізак», (1 мг/кг)	3,10 ± 0,61 p > 0,5; p ₁ > 0,5	0,63 ± 0,08 p > 0,05; p ₁ > 0,2	0,74 ± 0,21 p < 0,05; p ₁ < 0,05
4	ЛПС+ Лізоцим+кверцетин (1 мг/кг і 0,2 мг/кг)	3,43 ± 0,45 p = 1,0; p ₁ > 0,3	0,35 ± 0,10 p > 0,3; p ₁ > 0,3	0,56 ± 0,23 p > 0,3; p ₁ > 0,1
5	ЛПС+ лізоцим (1 мг/кг) + желатин (10 мг/кг)	2,40 ± 0,16 p < 0,05; p ₁ > 0,3	0,57 ± 0,13 p > 0,3; p ₁ > 0,3	0,61 ± 0,20 p > 0,05; p ₁ > 0,05

Примітка: p, p₁ – див. табл. 5.14.

У таблиці 5.16 представлені результати визначення активності еластази - біологічного маркера запалення. З отриманих даних видно, що аплікації ЛПС знижують активність еластази в щоці і в яснах, а попередні аплікації лізоцимвмісних сумішей істотно не впливають на досліджуваний показник. Виняток становить суміш лізоцим + желатин, достовірно знижуючи активність еластази в сироватці крові.

Таблиця 5.16.

Вплив лізоцимвмісних сумішей на активність еластази в тканинах щурів після аплікацій ЛПС

№ п/п	Група	Еластаза		
		Сироватка, мккат/дм ³	Щока, мккат/кг	Ясна, мккат/кг
1	Інтактна	118,3 ± 5,7	35,3 ± 4,5	29,9 ± 2,3
2	ЛПС	109,7 ± 3,5 p > 0,05	28,4 ± 1,3 p < 0,05	21,7 ± 2,2 p < 0,05
3	ЛПС+ «Лізак», (1 мг/кг)	107,9 ± 6,6 p > 0,05; p ₁ > 0,5	25,5 ± 1,2 p < 0,05; p ₁ > 0,05	26,8 ± 2,8 p > 0,3; p ₁ > 0,05
4	ЛПС+ Лізоцим+кверцетин (1 мг/кг і 0,2 мг/кг)	102,7 ± 6,7 p > 0,05; p ₁ > 0,05	27,2 ± 1,3 p < 0,05; p ₁ > 0,3	25,2 ± 2,1 p > 0,05; p ₁ > 0,05
5	ЛПС+ лізоцим (1 мг/кг) + желатин (10 мг/кг)	92,3 ± 8,3 p < 0,05; p ₁ < 0,05	31,7 ± 2,3 p > 0,3; p ₁ > 0,05	24,4 ± 2,2 p > 0,05; p ₁ > 0,3

Примітка: p, p₁ – див. табл. 5.14.

У таблиці 5.17 наведені активність каталази, вміст МДА і рівень індексу АПІ в сироватці крові. Аплікації ЛПС знижували активність каталази і індекс АПІ і лише препарат «Лізак» достовірно підвищував активність каталази і індекс АПІ.

Таблиця 5.17.

Вплив лізоцимвмісних сумішей на активність каталази, вміст МДА і індекс АПІ в сироватці крові щурів після аплікацій ЛПС

№ п/п	Група	Каталаза, мкат/дм ³	МДА, ммоль/л	АПІ
1	Інтактна	0,38 ± 0,01	0,89 ± 0,04	4,27 ± 0,15
2	ЛПС	0,29 ± 0,01 p < 0,01	0,88 ± 0,04 p > 0,7	3,29 ± 0,19 p < 0,05
3	ЛПС+ «Лізак», (1 мг/кг)	0,41 ± 0,04 p > 0,3; p ₁ < 0,01	0,91 ± 0,02 p > 0,5; p ₁ > 0,3	4,50 ± 0,20 p > 0,3; p ₁ < 0,05
4	ЛПС+ Лізоцим+кверцетин (1 мг/кг і 0,2 мг/кг)	0,31 ± 0,02 p < 0,05; p ₁ > 0,1	0,90 ± 0,02 p > 0,7; p ₁ > 0,3	3,45 ± 0,17 p < 0,05; p ₁ > 0,5
5	ЛПС+ лізоцим (1 мг/кг) + желатин (10 мг/кг)	0,28 ± 0,02 p < 0,01; p ₁ > 0,3	0,86 ± 0,02 p > 0,3; p ₁ > 0,3	3,26 ± 0,21 p < 0,05; p ₁ > 0,7

Примітка: p, p₁ – див. табл. 5.14.

У таблиці 5.18 представлені результати визначення активності каталази, вмісту МДА і індексу АПІ в слизовій щочі щурів після аплікації ЛПС.

Таблиця 5.18.

Вплив лізоцимвмісних сумішей на активність каталази, вміст МДА і індекс АПІ в щочі щурів після аплікацій ЛПС

№ п/п	Група	Каталаза, мкат/кг	МДА, ммоль/кг	АПІ
1	Інтактна	4,01 ± 0,31	5,64 ± 0,79	7,11 ± 0,82
2	ЛПС	5,19 ± 0,34 p < 0,05	14,75 ± 1,50 p < 0,01	3,52 ± 0,34 p < 0,05
3	ЛПС+ «Лізак»,	5,25 ± 0,30	9,87 ± 0,39	5,32 ± 0,38

	(1 мг/кг)	$p < 0,05; p_1 > 0,5$	$p < 0,05; p_1 < 0,05$	$p < 0,05; p_1 < 0,05$
4	ЛПС+ Лізоцим+кверцетин (1 мг/кг и 0,2 мг/кг)	$5,68 \pm 0,37$ $p < 0,05; p_1 > 0,2$	$6,54 \pm 0,74$ $p > 0,3; p_1 < 0,01$	$8,68 \pm 0,71$ $p > 0,05; p_1 < 0,05$
5	ЛПС+ лізоцим (1 мг/кг) + желатин (10 мг/кг)	$4,54 \pm 0,48$ $p > 0,3; p_1 > 0,2$	$6,41 \pm 0,61$ $p > 0,3; p_1 < 0,01$	$7,08 \pm 0,63$ $p > 0,8; p_1 < 0,05$

Примітка: p, p_1 – см. табл. 5.14.

З даних видно, що хоча ЛПС підвищує активність каталази на 29%, вміст МДА він збільшує в 2,6 рази, що в кінцевому підсумку знижує в 2 рази індекс АПІ.

Аплікації лізоцимвмісних препаратів мало впливають на активність каталази, проте достовірно знижують рівень МДА: «Лізак» на 33%, лізоцим з кверцетином на 56% і лізоцим з желатином на 57%. В результаті цього істотно підвищується індекс АПІ: після аплікацій «Лізак» на 51%, лізоциму з кверцетином - на 145% і лізоциму з желатином - на 101%.

У таблиці 5.19 представлені результати визначення активності каталази, вмісту МДА і індексу АПІ в яснах щурів після оральних аплікацій ЛПС. Як видно з представлених даних, ЛПС достовірно знижує активність каталази і вміст МДА, не змінюючи істотно індекс АПІ.

Аплікації лізоцимвмісних сумішей достовірно збільшують активність каталази, причому всі три препарати однаковою мірою (в 1,6-1,7 рази), при цьому мало змінюється рівень МДА. В результаті всі три лізоцимвмісних препарати достовірно збільшують індекс АПІ: Лізак на 52%, лізоцим з кверцетином на 167% і лізоцим з желатином на 49%.

Таблиця 5.19.

Вплив лізоцимвмісних сумішей на активність каталази, вміст МДА і індекс АПІ в яснах щурів після аплікацій ліпополісахариду

№ п/п	Група	Каталаза, мкат/кг	МДА, ммоль/кг	АПІ
1	Інтактна	$7,38 \pm 0,13$	$16,83 \pm 1,53$	$4,39 \pm 0,40$
2	ЛПС	$4,54 \pm 0,36$ $p < 0,01$	$9,23 \pm 1,35$ $p < 0,05$	$4,92 \pm 0,36$ $p > 0,3$
3	ЛПС+ «Лізак», (1 мг/кг)	$7,19 \pm 0,32$ $p > 0,3; p_1 < 0,01$	$9,62 \pm 0,59$ $p < 0,05; p_1 > 0,5$	$7,47 \pm 0,49$ $p < 0,05; p_1 < 0,05$
4	ЛПС+ Лізоцим+кверцетин (1 мг/кг и 0,2 мг/кг)	$7,68 \pm 0,25$ $p > 0,2; p_1 < 0,01$	$7,56 \pm 0,82$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$10,16 \pm 0,86$ $p < 0,05; p_1 < 0,05$
5	ЛПС+ лізоцим (1 мг/кг) + желатин (10 мг/кг)	$7,33 \pm 0,25$ $p > 0,8; p_1 < 0,04$	$10,00 \pm 0,33$ $p < 0,01; p_1 > 0,3$	$7,33 \pm 0,48$ $p < 0,05; p_1 < 0,05$

Примітка: p, p_1 – см. табл. 5.14.

Таким чином, проведені дослідження показали, що запропоновані композиції, в яких фермент лізоцим поєднувався або з кверцетином, або з желатином, підвищують в слизовій такиніні щоти рівень лізоциму в значно більшому ступені (в 2,2-2,5 рази), ніж препарат порівняння «Лізак» (всього лише в 1,2 рази). Аналогічний характер змін спостерігається і з індексом АПІ: під дією запропонованих нами лізоцимвмісних гелів він збільшується в 2-2,5 рази, тоді як препарат порівняння «Лізак» збільшує його всього в 1,5 рази.

Що стосується ясен, то запропоновані нами препарати мало відрізняються від препарату порівняння за впливом на рівень лізоциму, еластази, індексу АПІ, за винятком активності уреазі, що значно (в 2,2 рази) підвищилася після аплікацій референс-препарату «Лізак», і може свідчити про

збільшення мікробного обсіменіння ясен. У той же час препарат «Лізак» більшою мірою підвищував в сироватці крові активність каталази і індекс АПІ.

Висновки до розділу 5

На основі комплексу теоретичних, технологічних і аналітичних досліджень розроблена композиція нового лікувально-профілактичного препарату комбінованої дії «Лізоцим-ФОРТЕ».

Показано, що антимікробна дія лізоциму залежить від роду і штаму мікроорганізму; додавання хлоргексидину біглюконату в усіх випадках (щодо грамнегативних, грампозитивних бактерій і дріжджоподібних грибків) сприяє розширенню спектра антимікробної дії.

Однак виявлена фармацевтична взаємодія хлоргексидину біглюконату з більшістю компонентів, що входять до складу композиції, значно ускладнила його кількісне визначення в таблеткових сумішах і призвела до виключення хлоргексидину біглюконату з числа діючих компонентів.

Обрана технологія вологого гранулювання для отримання таблетованої маси іммобілізованого лізоциму. Вивчені фізико-хімічні та біохімічні властивості отриманих гранулятів (гідролітична активність, рН-оптимум, термооптимум, зберігання).

Визначені методи кількісного аналізу діючих компонентів таблеткових сумішей: лізоциму і кверцетину. Грануляти з використанням запропонованих чотирьох композицій наповнювачів, а саме лактози моногідрату, маніту, повідону К-17; лактози моногідрату, маніту, карамелози; цитрату кальцію, крохмалю, желатину зберігають фізичні, хімічні і механічні властивості протягом 1 року в герметично упакованому стані. З огляду на наявність у чинній композиції ензиму рекомендується зберігати суміші при температурі 0-4 °С.

Досліджено антимікробну і протизапальну дію таблеткових сумішей на 25 білих щурах лінії Вістар. Показано, що запропонована композиція, в якій лізоцим поєднується з кверцетином і мукоадгезивною полімерною матрицею на основі желатину і Na-КМЦ, підвищує в слизовій щокі рівень лізоциму в

2,2-2,5 рази, тоді як препарат «Лізак» в 1,2 рази; достовірно знижують рівень МДА: «Лізак» на 33%, іммобілізований лізоцим на 56%. В результаті цього значно підвищується відношення активності каталази та концентрації МДА як антиоксидантно-прооксидантного індексу (АПІ): після аплікацій «Лізак» на 51%, іммобілізованого лізоциму з кверцетином - на 145%.

Внаслідок проведеного комплексу досліджень найбільш перспективні щодо збереження бактеріолітичної активності лізоциму композиції були передані в ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» для впровадження на НВА «Одеська біотехнологія» у вигляді біологічно активної добавки «Лізоцим-ФОРТЕ».

Результати проведених досліджень опубліковані наступних роботах:

1. Романовська І.І., Декіна С.С., Псахіс І.Й., Псахіс Б.Й. Дослідження чутливості мікроорганізмів до комбінацій лізоциму з лікарськими речовинами. // Медична хімія. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 68-70.
2. Романовська І.І., Декіна С.С., Севастьянов О.В., Рогожа Є.О. Таблеткові суміші, що містять іммобілізований лізоцим і кверцетин: отримання, властивості // Медична та клінічна хімія. – 2017. – Т.19, № 2. – С. 19-24.
3. Декіна С.С., О.Є. Успенський, І.В. Гінжол, М.О. Остафійчук, А.П. Левицький. Вплив оральних аплікацій лізоцимвмісних гелів на стан слизової оболонки щурів після дії ліпополісахариду // Вісник стоматології. – 2016. - № 3. - С. 13-17.
4. Декина С.С., Успенский О.Е., Селиванская И.А., Хромагина Л.Н. Профилактическое действие на десну крыс фитогеля «Лизоцим-форте» при индометациновой интоксикации // Вісник стоматології. - 2019. - №2 (107). – С.14-18.
5. Патент України на корисну модель 136449. Поліфункціональний антидисбіотичний засіб «Лізоцим-Форте». МПК (2019.01) А61К 31/00, А61Р 1/00 / Левицький А.П., Романовська І.І., Декіна С.С., Остафійчук М.О., Бочаров А.В., Фурдичко А.І., Петренко О.А., Борис Г.З. Опубл. 27.08.2019.

РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ВІЛЬНОГО І ІММОБІЛІЗОВАНОГО ЛІЗОЦИМУ

Вивчення каталітичних властивостей іммобілізованих ензимів має важливе значення для розуміння існуючих взаємодій в ензим-полімерних системах. Природа носія, його хімічні та фізичні властивості впливають на зв'язування іммобілізованого ферменту з субстратом, швидкість реакції і, як результат, на ефективність каталітичного процесу. У цьому розділі увагу приділено дослідженню кінетики гідролізу клітин *Micrococcus lysodeikticus* лізоцимом, іммобілізованим у вищеописані матриці і порівнянню кінетичних характеристик з параметрами вільного ензиму.

В ході попередніх експериментів з вільним лізоцимом підібрали концентрацію субстрату таким чином, щоб приблизно перебувати в рекомендованому діапазоні, що охоплює обидві гілки кінетичної кривої, для більш точного визначення кінетичних параметрів ферментативної реакції [252]. Цей діапазон ($7,5 \cdot 10^{-3}$ – $4,8 \cdot 10^{-1}$ г) клітин *Micrococcus lysodeikticus* в 1 дм³ використовували в ході всіх подальших експериментів

Кінетичні параметри функціонування лізоциму досліджували для ензиму, іммобілізованого в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, кріогель полівінілового спирту і желатин.

Залежність швидкості реакції гідролізу лізоциму від концентрації субстрату у координатах Лайнуївера-Берка наведено на рис. 6.1. Вплив використаних для отримання іммобілізованих продуктів полімерів на кінетичні характеристики лізоциму проявляється наступним чином:

- а) збільшенням константи Міхаеліса K_M ;
- б) збільшенням максимальної швидкості реакції $V_{\text{макс}}$;
- в) збільшенням відношення $K_M/V_{\text{макс}}$ (в даному випадку, збільшенням тангенсів кутів нахилу відповідних графіків для лізоциму в присутності полімерів у порівнянні з вільним ензимом).

Зазначена ситуація відповідає розглянутій (в числі інших) картині перехідної активації в роботі [253].

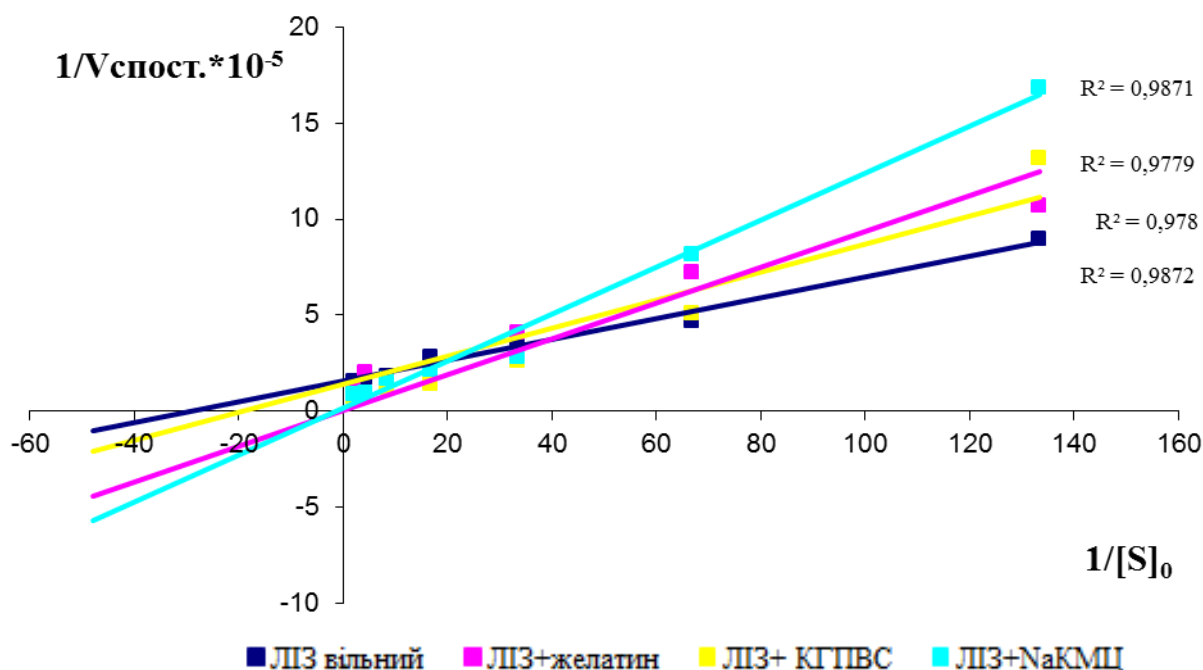


Рис. 6.1. Залежність швидкості реакції гідролізу лізоциму від концентрації субстрату в координатах Лайнуївера-Берка

Аналогічна картина спостерігається і при лінеаризації отриманих даних методом Хейнса (рис. 6.2), з тією відмінністю, що зростання відношення $K_M / V_{\text{макс.}}$ проявляється в збільшенні відрізків, що відсікаються екстрапольованими прямими на осі ординат ($[S]_0 / V_{\text{спост.}}$).

Отримані результати підтверджуються, з наданням для кожного з кінетичних параметрів (K_M і $V_{\text{макс.}}$) помилок визначення, розрахунковим методом Корніш-Боуден-Ейзенталя. Слід зазначити, що хоча в роботі [254] стверджується про непридатність для даного випадку параметричної статистики, проте ніяких доказів на користь такого твердження не наводиться.

Надалі автори представили спосіб знаходження як K_M і $V_{\text{макс.}}$, так і констант інгібування ензимів з використанням прийомів непараметричної статистики, проте теж ніяк не аргументуючи обґрунтованість такого підходу.

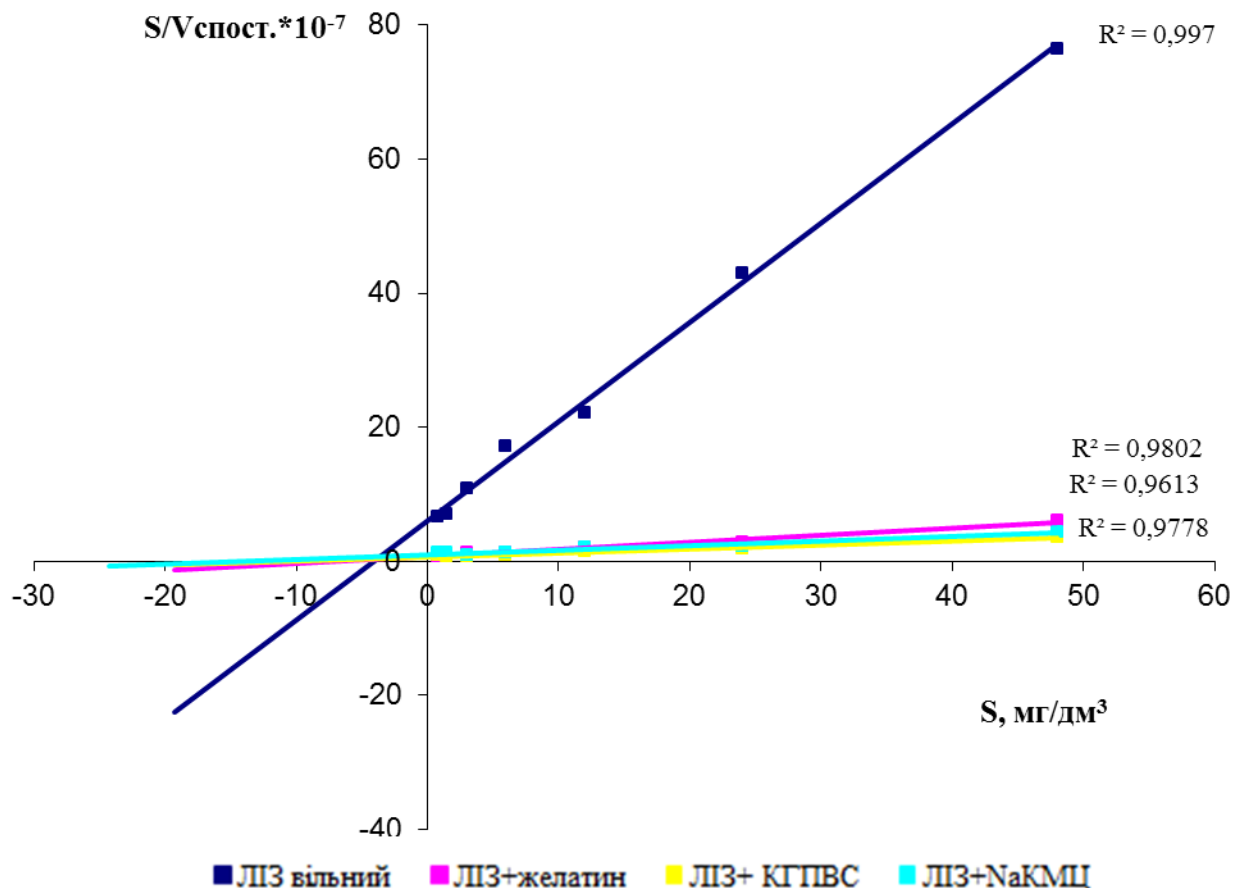


Рис. 6.2. Залежність швидкості реакції гідролізу лізоциму від концентрації субстрату в координатах Хейнса

Разом з тим, виявивши і відкинувши значення, що не належать до експериментальної вибірки, згідно [255], проаналізувавши нормальність розподілу решти вибірки по асиметрії і ексцесу, ми отримали відношення значень до їх помилок репрезентативності (тобто, A/m_A и E/m_E) для константи Міхаеліса в межах $1,187 \cdot 10^{-2}$ - $1,793$ і $2,377 \cdot 10^{-1}$ - $1,693$, відповідно. Оскільки ці відношення всюди <3 , розподіл значень є нормальним (гаусовим) і його правомірно аналізувати за критерієм Стюдента.

Отримані трьома методами лінеарізації отриманих даних, а саме Лайнуївера-Берка, Хейнса і Корніш-Боуден-Ейзенталя, значення кінетичних параметрів K_m і $V_{\text{макс.}}$ для вільного і іммобілізованого лізоциму, представлені в таблицях 6.1 і 6.2, відповідно.

Таблиця 6.1.

Константа Міхаеліса, Км, мг/дм³

Препарат	Метод Лайнуївера-Берка	Метод Хейнса	Метод Корніш-Боуден-Ейзенталя
Лізоцим вільний	34,5	40,9	34,8±3,5
Желатин + ЛІЗ (мукоадгезивні плівки з лізоцимом)	51,8	75,3	75,5±8,1
КГПВС + ЛІЗ	136,8	114,9	137,4±11,6
NaКМЦ+ ЛІЗ (мукоадгезивний гель з лізоцимом)	697,2	139,9	129,5±14,7

Таблиця 6.2.

Максимальна швидкість реакції, V_{макс}, од/мг лізоциму у хв

Препарат	Метод Лайнуївера-Берка	Метод Хейнса	Метод Корніш-Боуден-Ейзенталя
Лізоцим вільний	63743	67599	60338±2971
Желатин + ЛІЗ (мукоадгезивні плівки з лізоцимом)	70848	84974	89269±9385
КГПВС + ЛІЗ	146776	169432	193467±8977
NaКМЦ+ ЛІЗ (мукоадгезивний гель з лізоцимом)	570981	146306	139703±15574

Звертає на себе увагу близькість значень кінетичних параметрів при використанні всіх трьох методів їх визначення для вільного ферменту і розбіжність між даними для гелю з іммобілізованим лізоцимом по Лайнуїверу-

Берку і іншими двома методами. Це не дивно, якщо врахувати, що даний метод є, як неодноразово відзначено в літературі [254, 256, 257], найменш точним за своєю природою. Найбільшою мірою це позначається в області $[S]_0 < K_M$, тобто найбільш інформативною, оскільки саме в цьому діапазоні залежність $V_{\text{спост.}}$ від $[S]_0$ є значною.

Оскільки $V_{\text{макс.}} = k_{\text{кат}}[E]_0$, знайдені значення $k_{\text{кат}}$, а також відношення $k_{\text{кат}}/K_M$ як показники каталітичної ефективності лізоциму (таблиця 6.3). Збільшення $k_{\text{кат}}$ цілком зрозуміло, оскільки $[E]_0$ в ході експериментів змінювалася, зменшення ж $k_{\text{кат}}/K_M$ свідчать про зменшення швидкості зв'язування ферменту з субстратом.

Таблиця 6.3

Показники каталітичної ефективності лізоциму

Препарат	Метод Лайнуївера-Берка		Метод Хейнса		Метод Корніш-Боуден-Ейзенталя	
	$k_{\text{кат}}, \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{\text{кат}}/K_M$	$k_{\text{кат}}, \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{\text{кат}}/K_M$	$k_{\text{кат}}, \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{\text{кат}}/K_M$
Лізоцим вільний	$1,822 \cdot 10^4$	$5,281 \cdot 10^2$	$1,932 \cdot 10^4$	$4,721 \cdot 10^2$	$1,724 \cdot 10^4$	$4,955 \cdot 10^2$
Желатин + ЛІЗ (мукоадгезивні плівки з лізоцимом)	$2,025 \cdot 10^4$	$3,909 \cdot 10^2$	$2,428 \cdot 10^4$	$3,224 \cdot 10^2$	$2,551 \cdot 10^4$	$3,379 \cdot 10^2$
КГПВС + ЛІЗ	$4,194 \cdot 10^4$	$3,066 \cdot 10^2$	$4,842 \cdot 10^4$	$4,214 \cdot 10^2$	$5,530 \cdot 10^4$	$4,025 \cdot 10^2$
NaКМЦ+ ЛІЗ (мукоадгезивний гель з лізоцимом)	$1,632 \cdot 10^5$	$2,341 \cdot 10^2$	$4,181 \cdot 10^4$	$2,989 \cdot 10^2$	$3,991 \cdot 10^4$	$3,082 \cdot 10^2$

Розрахунки кінетичних параметрів трьома методами показали, що на значення K_M і $V_{\text{макс}}$ лізоциму білка курячих яєць в ході лізису пептидоглікану

клітинної стінки *Micrococcus lysodeikticus* меншою мірою впливає желатин, тоді як ПВС і Na-КМЦ діють значно сильніше і приблизно однаково. Що ж стосується $k_{кат}$, то всі три методи тут теж узгоджуються між собою в сенсі найменш помітного впливу желатину. Відносно $k_{кат} / K_M$ використання даних за Лайнуївером-Берком говорить про найбільш слабкий вплив на цей показник желатину, а результати за Хейнсом і Корніш-Боуден-Ейзенталем вказують на ПВС, як на полімер, що найменшою мірою впливає на каталітичну ефективність лізоциму.

Нарешті, користуючись представленою в роботі [253] формулою розрахунку значень константи перехідної активації, знайдені її значення для досліджуваних іммобілізованих зразків лізоциму за даними трьох методів визначення k_M і $V_{макс.}$ (таблиця 6.4).

Таблиця 6.4

Константа перехідної активації

Препарат	Метод Лайнуївера- Берка	Метод Хейнса	Метод Корніш- Боуден- Ейзенталя
Желатин + ЛІЗ (мукоадгезивні плівки з лізоцимом)	$1,817 \cdot 10^{-5}$ моль/дм ³	$1,061 \cdot 10^{-5}$ моль/дм ³	$7,384 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³
КГПВС + ЛІЗ	$5,146 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³	$7,080 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³	$4,5287 \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³
NaКМЦ+ ЛІЗ (мукоадгезивний гель з лізоцимом)	$3,206 \cdot 10^{-8}$ - $4,122 \cdot 10^{-9}$ моль/дм ³	$2,482 \cdot 10^{-7}$ - $3,191 \cdot 10^{-8}$ моль/дм ³	$2,206 \cdot 10^{-7}$ - $2,836 \cdot 10^{-8}$ моль/дм ³

Таким чином, в цьому розділі показано, що дія досліджуваних полімерів (желатину, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту) кінетично проявляється в перехідній активації ферменту, згідно картині лізису пептидоглікану клітинної стінки *Micrococcus lysodeikticus*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне обґрунтування та запропоновані нові підходи у вирішенні найважливішої наукової проблеми розвитку резистентності мікроорганізмів до антибіотиків шляхом проведення досліджень в області іммобілізації лізоциму - ензиму антимікробної і імуномодулюючої дії. На основі проведених досліджень та отриманих результатів сформульовані наступні висновки:

1. Встановлено, що запропонована модифікація способу виділення лізоциму з білка курячого яйця дозволила отримувати в лабораторних умовах ензим з чистотою 98% і гідролітичною активністю 22025 од/мг, яка відповідає такій фірмового препарату «AppliChem», перспективний для використання в біотехнологічних і біомедичних цілях.

2. Методом QSAR аналізу вперше отримано трьохпараметрову модель з використанням електронегативності за Полінгом, ентропії і ентальпії іонів металів як дескрипторів, що описує інгібуючий вплив металів і дозволяє з достатньою вірогідністю прогнозувати активність ензиму.

3. Показано, що стабілізація ензиму в розчинах декстрану і гідроксипропілметилцелюлози шляхом утворення іонних зв'язків між карбоксильними групами полімерів і аміногрупами лізоциму дозволила розробити мукоадгезивні очні краплі «штучна сльоза з лізоцимом», перспективні як для профілактики «синдрому сухого ока», так і для терапії травматичних кератитів з прискоренням ліквідації запалення і процесу епітелізації порівняно з контролем у 1,5 рази.

4. Шляхом іммобілізації лізоциму в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози розроблено мукоадгезивний гель, терапевтична ефективність якого посилена введенням біофлавоноїду кверцетину. Отриманий гель має високі адгезійні властивості до слизової оболонки (6000 Па), пролонговану дію, зберігає активність в кислому середовищі і при тривалому

зберіганні (1,5 роки), чинить лікувально-профілактичний ефект при захворюваннях пародонту.

5. Показано, що метод кріоіммобілізації лізоциму в полівініловому спирті дозволяє отримати покриття з кількісним збереженням білка і високою гідролітичною активністю ензиму. Препарат відрізняється розширеним рН-профілем активності, стабільний в кислому середовищі, зберігає 95% активності протягом 3 місяців, проявляє виражену антимікробну дію стосовно тест-штамів *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* і має протизапальну дію при модельованому ліпополісахаридом запаленні слизових оболонок порожнини рота.

6. Встановлено, що іммобілізація лізоциму в комплексну матрицю на основі желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози сприяє отриманню мукоадгезивних плівкових форм сайт-специфічного введення, пролонгованої дії, тривалого строку зберігання (3 роки). Препарат ефективний в лікуванні експериментального стоматиту у щурів зі зниженням показників запалення (еластази, МДА) і маркеру мікробного обсіменіння слизових оболонок на 63,2, 80,9 і 97,5%, відповідно.

7. На основі комплексу теоретичних, технологічних і аналітичних досліджень розроблені таблеткові суміші іммобілізованого лізоциму і кверцетину - препарату лікувально-профілактичної дії. Біологічно активна добавка «Лізоцим-ФОРТЕ» має пролонговану антимікробну, антиоксидантну, імуномодулюючу дії і введена на підприємстві НПА «Одеська біотехнологія» (Технічні умови України (ТУ У) 10.8-27420386-004: 2016).

8. Досліджені кінетичні параметри функціонування лізоциму після іммобілізації свідчать про вплив полімерів (желатину в меншій мірі, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту), який проявляється в збільшенні константи Міхаеліса, максимальної швидкості реакції і співвідношення $K_M/V_{\text{макс}}$, що пояснюється перехідною активацією ензиму

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kumar K., Friieri M., Boutin A. Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*. 2017. Vol. 10, № 4. P. 369-378.
2. Arias C.A., Munita J.M. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2016. P. 481-511.
3. Kishony R., Yelin I. Antibiotic resistance. *Cell*. 2018. Vol. 172, № 5. P. 1136-1136 e1131.
4. Benkerroum N. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 7, № 25. P. 4856-4867.
5. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Декина С.С. и др. Имобилизация биологически активных веществ с целью создания потенциальных диагностических и лекарственных средств. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2009. Т. 7, № 3(27). С. 69-78.
6. Dwevedi A. Basics of enzyme immobilization. *Enzyme immobilization*. 2016. P. 21-44.
7. Minteer S.D., Moehlenbrock M.J. Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. *Enzyme stabilization and immobilization*. 2017. P. 1-7
8. Emili A., Sleno L. Proteomic methods for drug target discovery. *Current opinion in chemical biology*. 2008. Vol. 12, № 1. P. 46-54.
9. Chen J., Liu D.-M., Shi Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 102, № P. 332-342.
10. Heng L.Y., Ahmad N.A., Hanifah S.A. et al. Polymeric films as matrixes for the immobilization of mixed natural dyes for optical pH sensor. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2019. Vol. 23, № 5. P. 799-811.

11. Khosravi-Darani K., Jahadi M. Liposomal encapsulation enzymes: from medical applications to kinetic characteristics. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2017. Vol. 17, № 4. P. 366-370.
12. Pedrero S.G., Fernandez-Lopez L., Lopez-Carrobles N. et al. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. *Enzyme and microbial technology*. 2017. Vol. 98, № P. 18-25.
13. Lesnierowski G., Cegielska-Radziejewska R., Szablewski T. et al. Physico-chemical properties and antibacterial activity of modified egg white—lysozyme. *European Food Research and Technology*. 2010. Vol. 231, № 6. P. 959-964.
14. Cegielska-Radziejewska R., Leśnierowski G. Potential possibilities of production, modification and practical application of lysozyme. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2012. Vol. 11, № 3. P. 223-230.
15. Giatrakou V.I., Ntzimani A.G., Savvaidis I.N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 C: microbiological and sensory evaluation. *Innovative food science and emerging technologies*. 2010. Vol. 11, № 1. P. 187-196.
16. Osserman E. Lysozyme. Elsevier, 2012. c.
17. Michiels C. W., Callewaert L. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of biosciences*. 2010. Vol. 35, № 1. P. 127-160.
18. Hejnal A.M., Dunn C.W., Pang D.Q. et al. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*. 2008. Vol. 452, № 7188. P. 745.
19. Fagutao F., Kaizu A., Kondo H. et al. Functional analysis of c-type lysozyme in penaeid shrimp. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286, № 52. P. 44344-44349.
20. Tian C., Zheng W., Chen X. Molecular characterization of goose-type lysozyme homologue of large yellow croaker and its involvement in immune response induced by trivalent bacterial vaccine as an acute-phase protein. *Immunology letters*. 2007. Vol. 113, № 2. P. 107-116.

21. Trueba M. Abad C., Campos A. Dilatometric, refractometric and viscometric study of lysozyme-cation interaction. *Biophysical Chemistry*. 1981. Vol. 14, № 3. P. 293-300.
22. Liu B. Yue X., Xue Q. An *i*-type lysozyme from the Asiatic hard clam meretrix potentially functioning in host immunity. *Fish and shellfish immunology*. 2011. Vol. 30, № 2. P. 550-558.
23. Hyun A., Abeyrathne N., Yong L. Sequential separation of lysozyme and ovalbumin from chicken egg white. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2013. Vol. 33, № 4. P. 501-507.
24. Montoure J.E., Sauter E.A. The relationship of lysozyme content of egg white to volume and stability of foams. *Journal of Food Science*. 1972. Vol. 37, № 6. P. 918-920.
25. Cole R.K., Wilcox F.H. The inheritance of differences in the lysozyme level of hens' egg white. *Genetics*. 1957. Vol. 42, № 3. P. 264.
26. Naumann R., Pusey M. Growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth*. 1986. Vol. 76, № 3. P. 593-599.
27. Kirby A.J. The lysozyme mechanism sorted—after 50 years. *Nature Structural Molecular Biology*. 2001. Vol. 8, № 9. P. 737–739.
28. Abeyrathne N.S., Hyun Y.L., Dong U. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. Sequential separation of lysozyme and ovalbumin from chicken egg white. 2013. Vol. 33, № 4. P. 501-507.
29. Strang R.H. Purification of egg-white lysozyme by ion-exchange chromatography. *Biochemical education*. 1984. Vol. 12, № 2. P. 57-59.
30. Sabatkova Z., Safarik I., Tokar O., Safarikova M. Magnetic cation exchange isolation of lysozyme from native egg white. *Food Technol. Biotechnol.* 2007. Vol. 45, №4. P. 355–359.
31. Yang C.-C., Chang H.-M., Chang Y.-C. Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. *Journal of agricultural food chemistry*. 2000. Vol. 48, № 2. P. 161-164.

32. Lu J., Wana Y., Cui Z. Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 2006. Vol. 48, № 2. P. 133-142.
33. A. Kirby. The lysozyme mechanism sorted - after 50 years. *News and views*. 2001. Vol. 12, № 9. P. 737-739.
34. Zhuravleva I.L., Antonov Y.A., Cardinaels R. Structural studies on the interaction of lysozyme with dextran sulfate. *Food Hydrocolloids*. 2015. Vol. 44. P. 71-80.
35. Роговин З.А. ХИМИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ. М.: «ХИМИЯ», 1972. 520 с.
36. Gonçalves R.B., Felizardo K.R., Schwarcz W.D. et al. An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and their association with caries experience and activity. *Revista Odonto Ciência*. 2010. Vol. 25, № 4. P. 344-349.
37. Sattari M., Moslemi M., Kooshki F. et al. Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with early childhood caries. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*. 2015. Vol. 9, № 2. P. 109.
38. Lin H.C., Hao G.F. Relationship of concentration of lactoferrin and lysozyme in saliva and dental caries in primary dentition. *Chinese journal of stomatology*. 2009. Vol. 44, № 2. P. 82-84.
39. Ellison R.T., Giehl T.J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of clinical investigation*. 1991. T. 88, № 4. P. 1080-1091.
40. González-Pombo P., Brena B., Batista-Viera F. R. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of enzymes and cells*. Springer. 2013. P. 15-31
41. Balkus J., Tran D.N., Kenneth J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *Acs Catalysis*. 2011. Vol. 1, № 8. P. 956-968.
42. ГОСТ Р ИСО 11137-2000. Стерилизация медицинской продукции. Требования к валидации и текущему контролю. Радиационная стерилизация.
43. Dwevedi A. Enzyme immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment. Springer, 2016. 141 p.
44. Tavlasoglu S., Altinkaynak C., Ocsoy I. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced

catalytic activity and stability. *Enzyme and microbial technology*. 2016. Vol. 93, P. 105-112.

45. Rene C.L., Datta S., Rajaram Y., Rani S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2013. Vol. 3, № 1. P. 1-9.

46. Karthick S., Nisha S., Gobi N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*. 2012. Vol. 1, № 3. P. 148-155.

47. Ortiz C., Rodrigues R., Berenguer-Murcia Á. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*. 2013. Vol. 42, № 15. P. 6290-6307.

48. Sariri R., Homaei A., Vianello F. Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology*. 2013. Vol. 6, № 4. P. 185-205.

49. Berenguer-Murcia Á., Garcia-Galan C., Fernandez-Lafuente R. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 2011. Vol. 353, № 16. P. 2885-2904.

50. Torres R., Barbosa O., Ortiz C. et al. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules*. 2013. Vol. 14, № 8. P. 2433-2462.

51. Hayat A., Sassolas A., Marty J.-L. Enzyme immobilization by entrapment within a gel network. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Springer. 2013. P. 229-239.

52. Marzuki N.H., Mohamad N.R., Nor A.H. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2015. Vol. 29, № 2. P. 205-220.

53. Guisan J.M. Immobilization of enzymes and cells. Springer. 2006. Vol. 22.

54. Yu Y., Dai G.-L., Kang Q.H. Studying aggregate in lysozyme solution by atomic force microscope. *Chinese Chemical Letters*. 2004. Vol. 15, № 10. P. 1237-1240.

55. Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T.P. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*. 2018. Vol. 8, № 2. P. 92.

56. Smart J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005. Vol. 57, № 11. P. 1556-1568.
57. Dünnhaupt S., Griebinger J., Cattoz B. et al. Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015. Vol. 96, № P. 464-476.
58. Prabhakar B., Roy S. Bioadhesive polymeric platforms for transmucosal drug delivery systems—a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2010. Vol. 9, № 1. P. 91-104.
59. Dhawan N., Kumar K., Sharma H. Bioadhesive polymers: novel tool for drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine and biotechnology*. 2014. Vol. 42, № 4. P. 274-283.
60. Kumar R. Poddar R., Pankaj S. et al. Bioadhesive polymers as a platform for drug delivery: possibilities and future trends. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*. 2010. Vol. 2, № 1. P. 1-6.
61. Sabatelle R., Balijepalli A., Chen M. et al. A synthetic bioinspired carbohydrate polymer with mucoadhesive properties. *Angewandte Chemie*. 2020. Vol. 132, № 2. P. 714-720.
62. Shojaei A.H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1998. Vol. 1, № 1. P. 15-30.
63. Kosaraju S., Dudhani A. Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization. *Carbohydrate polymers*. 2010. Vol. 81, № 2. P. 243-251.
64. Ларионова Н.И., Харенко Е.А., Демина Н.Б. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2009. Vol. 43, № 4. P. 21-29.
65. Andrade T., Santos L.S., Barbosa G. et al. Gelatin-based mucoadhesive membranes containing inclusion complex of thymol/ β -cyclodextrin for treatment of oral infections. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2019. Vol. № P. 1-11.
66. Rabiee M., Davoudi Z., Houshmand B. et al. Development of chitosan/gelatin/keratin composite containing hydrocortisone sodium succinate as a

buccal mucoadhesive patch to treat desquamative gingivitis. *Drug development and industrial pharmacy*. 2018. Vol. 44, № 1. P. 40-55.

67. Chetoni P.G., Bonferoni M.C., Paolo R. et al. Carrageenan–gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004. Vol. 57, № 3. P. 465-472.

68. Tauchi Y., Wang J., Deguchi Y. et al. Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of *H. pylori*. *Drug delivery*. 2000. Vol. 7, № 4. P. 237-243.

69. Jankowski K.T., Dembczyński R.B. Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two-phase system composed of ethylene oxide–propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate. *Process Biochemistry*. 2010. Vol. 45, № 3. P. 369-374.

70. Krutika K., Patil S.B. Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery. *Current drug delivery*. 2008. Vol. 5, № 4. P. 312-318.

71. Chang L.-C., Liu C.-W., Lin K.-J. et al. Preparation and characterization of gelatin-based mucoadhesive nanocomposites as intravesical gene delivery scaffolds. *BioMed research international*. 2014. Vol. 2014, № P. 1-12.

72. Verbeke N., Ugwoke M.I., Kinget R. Microencapsulation of apomorphine HCl with gelatin. *International journal of pharmaceutics*. 1997. Vol. 148, № 1. P. 23-32.

73. Winter G., Ofokansi K., Fricker G., Coester C. Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010. Vol. 76, № 1. P. 1-9.

74. Singh V.K., Sagiri S.S., Senthilguru B.I. et al. Stearate organogel–gelatin hydrogel based bigels: Physicochemical, thermal, mechanical characterizations and in vitro drug delivery applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2015. Vol. 43, № P. 1-17.

75. Adikwu M.U., Ofokansi K.C., Okore V.C. Industrial Pharmacy. Preparation and evaluation of mucin-gelatin mucoadhesive microspheres for rectal delivery of ceftriaxone sodium. *Drug development*. 2007. Vol. 33, № 6. P. 691-700.

76. Patel C.J., Kotagale N.R., Parkhe A.P. et al. Carbopol 934-sodium alginate-gelatin mucoadhesive ondansetron tablets for buccal delivery: effect of pH modifiers. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2010. Vol. 72, № 4. P. 471.
77. Carvalho E., Dharmendra J., Kumar B.A. et al. Development of polyvinyl alcohol–gelatin membranes for antibiotic delivery in the eye. *Drug development industrial pharmacy*. 2011. Vol. 37, № 2. P. 167-177.
78. Bigucci F., Abruzzo A., Cerchiara T. et al. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydrate polymers*. 2012. Vol. 87, № 1. P. 581-588.
79. Parridhi J., Khairnar A., Baviskar D. et al. Developmement of mucoadhesive buccal patch containing aceclofenac: *in vitro* evaluations. *Int J PharmTech Res*. 2009. Vol. 1, № 4. P. 978-981.
80. Subadhra S., Ravindran V., Banji D. Comparative study of mucoadhesive polymers carbopol 974p and sodium carboxymethyl cellulose for single unit dosage of imatinib mesylate. *Malaysian journal of pharmaceutical sciences*. 2012. Vol. 10, № 1. P. 61-77.
81. Zulkar N., Boddupalli B., Ravinder A. et al. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology and research*. 2010. Vol. 1, № 4. P. 381.
82. Fiza F., Sudhir B., Jat R. et al. Buccal Patches: a review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2013. T. 3, №. 4. C. 3324-3334.
83. Rao Y.S., Chowdary K.P. Preparation and evaluation of mucoadhesive microcapsules of indomethacin. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2003. Vol. 65, № 1. P. 49-52.
84. Bonferoni M.C., Rossi S., Ferrari F.C. Technology. Drug release and washability of mucoadhesive gels based on sodium carboxymethylcellulose and polyacrylic acid. *Pharmaceutical development*. 1999. Vol. 4, № 1. P. 55-63.
85. Gopal N., Karthikeyan K., Pandit J. Sodium alginate based mucoadhesive system for gatifloxacin and its *in vitro* antibacterial activity. *Scientia pharmaceutica*. 2010. Vol. 78, № 4. P. 941-958.

86. Fusun A. Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent patents on drug delivery formulation*. 2009. Vol. 3, № 3. P. 193-205.
87. Bergamante V., Fini A., Ceschel G. Mucoadhesive gels designed for the controlled release of chlorhexidine in the oral cavity. *Pharmaceutics*. 2011. Vol. 3, № 4. P. 665-679.
88. Raghuwanshi N., Vashisth P., Srivastava A. et al. Ofloxacin loaded gellan/PVA nanofibers-synthesis, characterization and evaluation of their gastroretentive/mucoadhesive drug delivery potential. *Materials Science and Engineering: C*. 2017. Vol. 71, № P. 611-619.
89. He R., Ding J., Zhou G. et al. Multilayered mucoadhesive hydrogel films based on thiolated hyaluronic acid and polyvinylalcohol for insulin delivery. *Acta Biomaterialia*. 2012. Vol. 8, № 10. P. 3643-3651.
90. Enlow E., Popov A., Bourassa J. et al. Mucus-penetrating nanoparticles made with “mucoadhesive” poly (vinyl alcohol). *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016. Vol. 12, № 7. P. 1863-1871.
91. Ermonlina M.N., Khutoryanskiy V. Investigation of physicochemical properties of PVA-GANT mucoadhesive hydrogels. *British Journal of Pharmacy*. 2017. Vol. 2, № 2. P. 33-34.
92. Petrovic S., Banka L., Becarevic A. Lysozyme Isolation from hen egg-white on Fractogel TSK CM-650. *Food Science and Technology*. 1993. Vol. 26, № 1. P. 76-78.
93. Kasakov A.S., Artemova N.V., Bumagina Z.M. et al. Protein aggregates as depots for the release of biologically active compounds. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008. Vol. 377, № 2. P. 595-599.
94. Lai S.K., Yang M., Yu T. et al. Nanoparticle penetration of human cervicovaginal mucus: the effect of polyvinyl alcohol. *Journal of controlled release*. 2014. Vol. 192, P. 202-208.
95. Muppalaneni S.O. Polyvinyl alcohol in medicine and pharmacy: a perspective. *J. Dev. Drugs*. 2013. Vol. 2, № 3. P. 1-5.
96. Abbas Z., Swamy N. Preparation and *in vitro* characterization of mucoadhesive polyvinyl alcohol microspheres containing amlodipine besylate for

nasal administration. *Indian Journal of Pharmacy Education*. 2012. Vol. 46, № 1. P. 52-58.

97. Vavia P.R., Darandale S.S. Design of a gastroretentive mucoadhesive dosage form of furosemide for controlled release. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2012. Vol. 2, № 5. P. 509-517.

98. Dharmendra J., Carvalho E., Banthia A. K. et al. Development of polyvinyl alcohol–gelatin membranes for antibiotic delivery in the eye. 2011. Vol. 37, № 2. P. 167-177.

99. US Patent 5.047.244 Leung S.-H. S. Sanvordeker D.R. Mucoadhesive carrier for delivery of therapeutical agent. 1991.

100. Mongia N.K., Peppas N.A. Ultrapure poly (vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1997. Vol. 43, № 1. P. 51-58.

101. Bunt C., Chen G., Wen J. Mucoadhesive polymers-based film as a carrier system for sublingual delivery of glutathione. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015. Vol. 67, № 1. P. 26-34.

102. Толстих П.И., Власов Л.Г., Гнатюк Т.Е. Получение иммобилизованного на текстильных носителях лизоцима и его применение для лечения гнойных ран. *Антиб. и химиотер.* 1988. Vol. № 11. P. 848 – 850.

103. Вальхичина М.Н., Немцова Н.Н. О модификации лизоцима водорастворимым полимером «Совиаль». *Хим.-фарм. журн.* . 1987. Vol. 21, № 7. P. 782 – 785.

104. Кравченко Н.А., Черкасов И.А., Павловский П.Е. Получение и свойства лизоцима, иммобилизованного на силохроме. *Биоорганическая химия*. 1976. Vol. 2, № 10. P. 1422-1428.

105. Tanabe T., Kurimoto A., Tachibana A. Keratin sponge: immobilization of lysozyme. *Journal of bioscience bioengineering*. 2003. Vol. 96, № 3. P. 307-309.

106. Del Nobile M.A., Buonocore G.G., Panizza A. et al. Modeling the lysozyme release kinetics from antimicrobial films intended for food packaging applications. *Journal of Food Science*. 2003. Vol. 68, № 4. P. 1365-1370.

107. Giovanna G.B., Conte A.B. et al. Immobilization of lysozyme on polyvinylalcohol films for active packaging applications. *Journal of food protection*. 2006. Vol. 69, № 4. P. 866-870.
108. Santosh V.P., Devi G.S. Immobilization of lysozyme on woven silk. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*. 1989. Vol. 4, № 1. P. 19-23.
109. Claro L.C., Assis O.B.G. Immobilized lysozyme protein on fibrous medium: Preliminary results for microfiltration applications. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003. Vol. 6, № 2. P. 161-167.
110. Shao L.L., Ding H.-M., Run-Jing X. Silica nanotubes for lysozyme immobilization. *Journal of Colloid Interface Science*. 2005. Vol. 290, № 1. P. 102-106.
111. Ku M.-C., Lee C.-K. Lysis of *Micrococcus lysodeikticus* cells by lysozyme covalently immobilized on the lumen of hollow fibers. *Biotechnology techniques* 1994. Vol. 8, № 3. P. 193-198.
112. Ajayan A., Miyahara M.V. Immobilization of lysozyme onto pore-engineered mesoporous AlSBA-15. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2006. Vol. 6, № 6. P. 1765-1771.
113. Ramón D., Tortajada M., Beltrán D.A. Hierarchical bimodal porous silicas and organosilicas for enzyme immobilization. *Journal of Materials Chemistry*. 2005. Vol. 15, № 35-36. P. 3859-3868.
114. Костина В.В. Хронический бронхит: этиология, патогенез, особенности клиники и лечения. *Нижегородский мед. ж.* 2002. Vol. № 1. P. 129-134.
115. Almasi H., Bayazidi P., Asl A. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 107, P. 2544-2551.
116. Посохина Е.Д., Ронжин Н.О., Барон А.В., Бондарь В.С. Оценка активности лизоцима после его ковалентной иммобилизации на наноалмазы детонационного синтеза. *Вестник КрасГАУ*. 2016. Vol. № 8. P. 38-44.
117. Virendra V., Kiristi M., Ávila E.-F. et al. Lysozyme-based antibacterial nanomotors. *ACS Nano*. 2015. Vol. 9, № 9. P. 9252-9259.

118. Ruiling L., Wang D., Ma X. et al. Lysozyme immobilization on the calcium alginate film under sonication: development of an antimicrobial film. *Food Hydrocolloids*. 2018. Vol. 83. P. 1-8.
119. Yang Y.J., Jiang S.Q., Li M. Enhanced antibacterial activity of lysozyme immobilized on chitin nanowhiskers. *Food Chemistry*. 2017. Vol. 221, P. 1507-1513.
120. Díaz-Gómez L., Guadarrama-Zempoalteca Y., Meléndez-Ortiz H. et al. Lysozyme immobilization onto PVC catheters grafted with NVCL and HEMA for reduction of bacterial adhesion. *Radiation Physics and Chemistry*. 2016. Vol. 126, P. 1-8.
121. Concheiro A., Diaz-Gomez L., Alvarez-Lorenzo C. Functionalization of titanium implants with phase-transited lysozyme for gentle immobilization of antimicrobial lysozyme. *Applied Surface Science*. 2018. Vol. 452, P. 32-42.
122. Cai M., Liu W., He Y. et al. Development of antibacterial polyacrylonitrile membrane modified with a covalently immobilized lysozyme. *RSC Advances*. 2015. Vol. 5, № 103. P. 84432-84438.
123. Matolygina D.A., Levashov P.A., Ovchinnikova E.D. et al. A novel method of covalent lysozyme immobilization for the development of materials for medical applications. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2019. Vol. 45, № 2. P. 101-106.
124. Klimchuk S., Ye Y., Shang M. Improved antibacterial performance using hydrogel-immobilized lysozyme as a catalyst in water. *RSC Advances*. 2019. Vol. 9, № 35. P. 20169-20173.
125. Rodríguez-Córdova F.J., Hernández-Téllez C.N., Rosas-Burgos E.C. et al. Activity of chitosan–lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and β -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech*. 2017. Vol. 7, № 5. P. 279-292.
126. Nizuka T., Nakamae K., Miyata T., Uragami T. et al. Stimuli-sensitive release of lysozyme from hydrogel containing phosphate groups. Springer, 1996. 313-314 c.
127. Sung K.W., Ogata N., Feijen J. et al. Advanced biomaterials in biomedical engineering and drug delivery systems. Springer Science & Business Media, 2012. c.

128. Hatree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972. Vol. 48. P. 422-427.
129. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976. Vol. 72, № 1-2. P. 248-254.
130. Дарбре А. Практическая химия белка. М: Мир. 1989. 621 с.
131. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *J Biochimica et biophysica acta.* 1952. Vol. 8, P. 302-309.
132. Пат. СССР МКИ С 12 N 9/36 Андерсон П.П. Микельсон В.Я., Каулиньш У.Я. Способ выделения лизоцима. 1984.
133. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 265с.
134. Osborn M., Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 1969. Vol. 244, № 16. P. 4406-4412.
135. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
136. Дерягин Б.В., Духин С.С. Электрофорез. М: "Наука", 1976. 332 с.
137. Рёнц Б., Фёрстер Э. Методы корреляционного и регрессионного анализа: Руководство для экономистов. М.: Финансы и статистика, 1983. С. 100-150.
138. Шестеренко Е.А., Андронати С.А., Артеменко А.Г. и др. Исследование влияния ионов металлов на активность карбоксилэстеразы печени свиньи методом QSAR. *Доповіди НАН України.* 2012. № 9. P. 154-158.
139. Жарский И.М.б Волков А.И. Большой химический справочник. Мн.: "Современная школа", 2005. 608 с.
140. Ziegler C.J., Binkley S.L., Herrick R.S., Rowlett R.S. Specific derivatization of lysozyme in aqueous solution with $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})^{3+}$. *Chemical communications.* 2010. Vol. 46, № 8. P. 1203-1205.
141. Shikiba Y., Ogura H., Yamazaki Y. Quantitative analysis of flavonoids. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1968. Vol. 57, № 4. P. 705-706.

142. Kusaka Y., Aoki M. Colorimetric determination of chlorhexidine. *Yakuzaigaku*. 1966. Vol. 26, № 1. P. 58.
143. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. *Успехи химии*. 1998. Vol. 67, № 7. P. 641-655.
144. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование как путь формирования макропористых и сверхмакропористых гелевых матриц биотехнологического назначения. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2008. Т. 18, № 2. С. 167.
145. Larionova N.I., Kharenko E.A., Demina N.B. Mucoadhesive drug delivery systems: quantitative assessment of interaction between synthetic and natural polymer films and mucosa. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008. Vol. 42, № 7. P. 392-399.
146. Плесов А.А., Березин И.В., Рабинович М.Л. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. *Биоорганическая химия*. 1976. Vol. 2, № 5. P. 680-688.
147. Макаренко О.А., Левицкий А.П., Селиванская И.А. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про-и пребиотиков: метод. рекомендации. К.: ГФЦ, 2007. 124 с.
148. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965. 432 с.
149. Romanovskaya I.I., Dekina S.S., Sotnikova E.P., Abramova A.B. Preparation and properties of lysozyme-containing eye drops for tear-substitutive therapy. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019. T.53, №8. P. 755-758.
150. Ципкун А.Г., Чайка Л.А., Гайдамака Т.Б. и др. Методические рекомендации "Экспериментальное изучение безвредности и фармакологической активности глазных лекарственных средств". К.: "Авиценна", 2003. 43 с.
151. Пат. Україна 2006 01643. МПК: А61В 5/00 Спосіб оцінки дисбактеріозу порожнини рота / Почтар В.М. Гончарук С.В., Левицький А.П.
152. Плохинский Н.А. Биометрия. Изд-во СО АН СССР, 1961. 364 с.
153. Strang R.H. Purification of egg-white lysozyme by ion-exchange chromatography. *Biochemical Education*. 1984. Vol. 12, № 2. P. 57-59.

154. Yang C.-C., Chang H.M., Chang Y.C. Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. Vol. 48, № 2. P. 161-164.
155. Shaochuan S., Yan L., Yun J. Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2011. Vol. 19, № 5. P. 876-880.
156. Lin C.-W., Chiu H.-C., Suen S.-Y. Isolation of lysozyme from hen egg albumen using glass fiber-based cation-exchange membranes. *Journal of Membrane Science*. 2007. Vol. 290, № 1. P. 259-266.
157. Piot M., Vachier M.C., Awadé A.C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995. Vol. 664, № 1. P. 201-210.
158. Su C.K., Chiang B.H., Tsai G.J. Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography. *Journal of Food Science*. 1993. Vol. 58, № 2. P. 303-306.
159. Cui Z.F., Ghosh R. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane pretreatment. *Journal of Membrane Science*. 1998. Vol. 139, № 1. P. 17-28.
160. Cui Z.F., Ghosh R. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. *Biochemical engineering journal*. 2000. Vol. 6, № 1. P. 19-24.
161. Ridvan D.A., Odabaşı M.S. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering: C*. 2007. Vol. 27, № 1. P. 90-99.
162. Lu J., Zhang H., Han B. Precipitation of lysozyme solubilized in reverse micelles by dissolved CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2001. Vol. 20, № 1. P. 65-71.
163. Chiang B.-H., Chou S.-T. Reversed micellar extraction of hen egg lysozyme. *Journal of Food Science*. 1998. Vol. 63, № 3. P. 399-402.
164. Chiang B.H., Su C.-K. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*. 2006. Vol. 41, № 2. P. 257-263.

165. Lundh G., Johansson H.-O., Karlström G. et al. Effects of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide co-polymers. *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects*. 1996. Vol. 1290, № 3. P. 289-298.
166. Asenjo J.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *Journal of Chromatography A*. 2011. Vol. 1218, № 49. P. 8826-8835.
167. Qiao J., Zhang M., Qi L. Dual-functional polymer-modified magnetic nanoparticles for isolation of lysozyme. *Analytica Chimica Acta*. 2018. Vol. 1035, P. 70-76.
168. Šafaraříková M., Šafařík I. Batch isolation of hen egg white lysozyme with magnetic chitin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1993. Vol. 27, № 4. P. 327-330.
169. Xu K., Shao D., Song X. Effective adsorption and separation of lysozyme with PAA-modified Fe₃O₄ silica core/shell microspheres. *Journal of colloid interface science*. 2009. Vol. 336, № 2. P. 526-532.
170. Gonzalez U.A., Ferraris M., Aguilar C.F. et al. An experimental model of affinity filtration for the isolation of egg white lysozyme using Cibacron Blue immobilized to yeast cells. *Journal of Chromatography B*. 2016. Vol. 1020, P. 129-133.
171. Rao M.V., Roy I., Gupta M.N. Purification of lysozyme from other hen's-egg-white proteins using metal-affinity precipitation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003. Vol. 37, № 1. P. 9-14.
172. Freitag R., Hilbrig F. Protein purification by affinity precipitation. *Journal of chromatography B*. 2003. Vol. 790, № 1-2. P. 79-90.
173. Iwai D.K., Noritomi H., Ryotaro T. et al. Adsorption of lysozyme on biomass charcoal powder prepared from plant biomass wastes. *Journal of chemical engineering of Japan*. 2013. Vol. 46, № 3. P. 196-200.
174. Andersson K., Freyhul E.K., Mats G. Structural modeling extends QSAR analysis of antibody-lysozyme interactions to 3D-QSAR. *Biophysical Journal*. 2003. Vol. 84, № 4. P. 2264-2272.

175. Yu L., Yang R., Zeng H. et al. The interaction of flavonoid-lysozyme and the relationship between molecular structure of flavonoids and their binding activity to lysozyme. *Journal of fluorescence*. 2012. Vol. 22, № 6. P. 1449-1459.
176. Huerta P., Olmo R., Blanco D. Viscometric, densimetric, and spectrophotometric study of lysozyme-Zn (II) and lysozyme-Hg (II) interactions. *Journal of inorganic biochemistry*. 1992. Vol. 47, № 2. P. 89-97.
177. Hussain R.C., Hughes A.J., Cesare G. et al. A zinc complex of heparan sulfate destabilises lysozyme and alters its conformation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012. Vol. 425, № 4. P. 794-799.
178. Краснокутская Л.М., Коршун М.Н. Соли как объект гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны. *Український журнал з проблем медицини праці*. 2011. Vol. № 1. P. 35-41.
179. Борзова Н.В., Гудзенко Е.В., Варбанец Л.Д. Влияние ионов металлов и специфических химических реагентов на активность α -L-рамнозидазы *Eurpenicillium erubescens*. *Український біохімічний журнал*. 2012. Vol. 84, № 2. P. 30-41.
180. Тагунова И.К., Романовская И.И., Пухлик С.М. Иммобилизация литического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*. *Одес. мед. журн*. 2007. Vol. № 1. P. 24-29.
181. Wyss O., Goldschmidt M.C. The role of tris in EDTA toxicity and lysozyme lysis. *Microbiology*. 1967. Vol. 47, № 3. P. 421-431.
182. Shelley D., Spahn C.M. Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent patents on engineering*. 2008. Vol. 2, № 3. P. 195-200.
183. Guisan J.M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins. *Immobilization of enzymes and cells*. 2006. Vol. 1-13
184. Cao L. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*. 2005. Vol. 9, № 2. P. 217-226.
185. Gardossi L., Hanefeld U., Magner E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*. 2009. Vol. 38, № 2. P. 453-468.
186. Jordaan J., Brady D. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*. 2009. Vol. 31, № 11. P. 1639-1650.

187. Kasche V., Tischer W. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends in Biotechnology*. 1999. Vol. 17, № 8. P. 326-335.
188. Уильямс Х., Уильямс В. Физическая химия для биологов. М: "Мир", 1976. 600 с.
189. Kasakov A.S., Artemova N.V., Bumagina Z.M. et al. Protein aggregates as depots for the release of biologically active compounds. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008. Vol. 377, № 2. P. 595-599.
190. Жиякова Е.Т., Придачина Д.В., Новикова М.Ю. и др. Современное состояние исследований по офтальмологическим лекарственным формам, направленным на профилактику и лечение синдрома «сухого глаза». *Современные проблемы науки и образования*. 2011. № 6. С. 310.
191. Куренков В.В., Полунин Г.С., Сафонова Т.Н. Новая клиническая классификация синдрома сухого глаза. *Катарактальная и рефракционная хирургия*. 2003. Vol. 3, № 3. P. 53-56.
192. Bron A.J. The definition and classification of dry eye disease. *Dry Eye*. 2015. Vol. 1-19
193. Colin C. Dry Eye. A Practical Approach. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. 121 p.
194. В.Н. Коваленко. КОМПЕНДИУМ 2017 — лекарственные препараты. Киев Морион, 2017.
195. Alison M. Antimicrobial compounds in tears. *Experimental eye research*. 2013. Vol. 117, № P. 53-61.
196. William H., Frey I.I., Desota-Johnson D., Hoffman C. Effect of stimulus on the chemical composition of human tears. *American journal of ophthalmology*. 1981. Vol. 92, № 4. P. 559-567.
197. Сомов Е.Е., Бржеский В.В. Слеза: физиология, методы исследования, клиника. М: "Наука", 1994. с.
198. Kim H., Lim H.-L., Jun J. Development of hyaluronic acid-functionalized hydrogel lens and characterization of physical properties and lysozyme adsorption. *Journal of Korean Ophthalmic Optics Society*. 2015. Vol. 20, № 3. P. 285-291.

199. Lin Q., Wang B., Jin T. et al. Surface modification of intraocular lenses with hyaluronic acid and lysozyme for the prevention of endophthalmitis and posterior capsule opacification. *Rsc Advances*. 2015. Vol. 5, № 5. P. 3597-3604.
200. Pat. JPH069430A Nobuo K. Misao K., Yuriko Y. Stable eye lotion compounded with lysozyme. 1994.
201. Pat. JPS5394007A Yoshio I. Kohei I., Shigemitsu O. Preparation containing lysozyme or its acid salt. 1978.
202. Sener G., Perçin I., Demirçelik A.H. et al. Comparison of two different reactive dye immobilized poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel discs for purification of lysozyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015. Vol. 175, № 6. P. 2795-2805.
203. Bright F.V., Morgan P.B., Burke S.E. et al. Contemporary research in contact lens care. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2013. Vol. 36. P. 22-27.
204. Andersen M.B., Weert M., Frokjaer S. Complex coacervation of lysozyme and heparin: complex characterization and protein stability. *Pharmaceutical Research*. 2004. Vol. 21, № 12. P. 2354-2359.
205. Whistler R.L., Bemiller J.N. Industrial gums: polysaccharides and their derivatives. Academic Press, 2012. 820 p.
206. Рощина Л.Л., Борисова О.А. Пролонгаторы и консерванты в технологии глазных капель для лечения синдрома "сухого глаза". *Инновационные технологии в медицине и фармакологии*. 2016. С. 53-61
207. Ash M. Handbook of preservatives. Synapse Info Resources, 2004. 874 p.
208. Xu W., Li Z., Zhang C., Chen Y. Self-assembled lysozyme/carboxymethylcellulose nanogels for delivery of methotrexate. *International journal of biological macromolecules*. 2015. Vol. 75. P. 166-172.
209. Кузин М. Костюченко Б. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей.-2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина. 1990. 592 с.
210. Давиденко Т.И., Чуенко А.В., Шинкаренко Л.Н. и др. Совместная иммобилизация литических и протеолитических ферментов. *Хим. прир. соед.* 1990. № 4. С. 528 – 532.

211. Forget A., Ninan N., Shastri V. et al. Antibacterial and anti-inflammatory pH-responsive tannic acid-carboxylated agarose composite hydrogels for wound healing. *ACS applied materials*. 2016. Vol. 8, № 42. P. 28511-28521.
212. Gabriele D'a. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*. 2015. Vol. 106, № P. 256-271.
213. Spagnuolo C., Russo M., Tedesco I. et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*. 2012. Vol. 83, № 1. P. 6-15.
214. Regelson W., Formica J.V. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 1995. Vol. 33, № 12. P. 1061-1080.
215. Sun C., Wang W., Mao L. et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016. Vol. 56, № P. 21-38.
216. Машковский М.Д. Лекарственные средства (16-е изд.). РИА «Новая волна», 2014. 1216 с.
217. Konecke S., Li B., Harich K. et al. Solid dispersion of quercetin in cellulose derivative matrices influences both solubility and stability. *Carbohydrate Polymers*. 2013. Vol. 92, № 2. P. 2033-2040.
218. Хуторянский В.В., Киржанова Е.А., Балабушевич Н.Г. и др. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014. Vol. 8, № 3. P. 58-72.
219. Ларионова Н.И.б Харенко Е.А., Демина Н.Б. Мукоадгезивные лекарственные формы: количественная оценка взаимодействия пленок из синтетических и природных полимеров со слизистой тканью. *Химико-фармацевтический журнал*. 2008. Vol. 42, № 7. P. 17-24.
220. Семкина О.А. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов)(обзор) *Химико-фармацевтический журнал*. 2005. Т. 39, №. 9. С. 45-48.

221. Котенко А.М., Перцев И.М., Чуешов О.В. и др. Фармацевтические и биологические аспекты мазей. Монография. Вид-во НФаУ: "Золоті сторінки", 2003. 285 с.
222. Хишова О.М., Бычкова Т.В., Яремчук А.А. Вспомогательные вещества в производстве мазей. *Вестник фармации*. 2009. №. 4. С. 97-105.
223. Николаев Н.П. Технология мазей К.: МОРИОН, 1998. 250 с.
224. Лукин Ю.В., Марквичева Е.А., Зайцев С.Ю. Молекулярное конструирование полимерных материалов для биотехнологии и медицины. *Биоорганическая химия*. 1999. Vol. 25, № 11. P. 868-880.
225. Gracheva I.M., Martynenko N.N., Sarishvili N.G. et al. Immobilization of champagne yeasts by inclusion into cryogels of polyvinyl alcohol: means of preventing cell release from the carrier matrix. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004. Vol. 40, № 2. P. 158-164.
226. Lozinsky V.I. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application. *Russian Chemical Reviews*. 2002. Vol. 71, № 6. P. 489-511.
227. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. *Успехи химии*. 1998. Vol. 67, № 7. P. 641-655.
228. Фогораси М.С., Шаскольский Б.Л., Станеску М.Д. и др. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. VII. Композитные иммобилизованные биокатализаторы с частицами ферментного препарата, включенного в матрицу криогеля поливинилового спирта. *Биотехнология*. 2009. Vol. № 1. P. 71-82.
229. Колосова О.Ю., Колесникова Е.С., Лозинский В.И. Криогели поливинилового спирта, содержащие добавки биологически активных веществ. *Успехи в химии и химической технологии*. 2017. Vol. 31, № 12 (193). P. 21-23.
230. Tokuda M., Tamura M., Nagaoka S. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infection and immunity*. 1992. Vol. 60, № 11. P. 4932-4937.

231. Destat.F., Zhou Q., Matthew G. Infection, immunity. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein. *Infection and immunity*. 2005. Vol. 73, № 2. P. 935-943.
232. Laffleur F. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. *Drug development industrial pharmacy*. 2014. Vol. 40, № 5. P. 591-598.
233. Veis A. The macromolecular chemistry of gelatin. 1964. Vol. 433 p.
234. Декина С., Романовская И., Андронати С. Конструирование иммобилизованных белковых веществ. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2012. 335 с.
235. Romanovska I., Dekina S., Ovsepyan A. et al. Gelatin/carboxymethyl cellulose mucoadhesive films with lysozyme: development and characterization. *Carbohydrate polymers*. 2016. Vol. 147. P. 208-215.
236. Romanovska I.I., Dekina S.S., Leonenko I.I. et al. Mucoadhesive gel with immobilized lysozyme: preparation and properties. *Biotechnologia Acta*. 2015. Vol. 8, № 3. P. 104-109.
237. Левицький А.П., Романовська І.І., Декіна С.С. та ін. Мукоадгезивний гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015. Т. 31, № 3. P. 30-40.
238. Sasaki H. et al. Effect of preservatives on systemic delivery of insulin by ocular instillation in rabbits. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 1994. Т. 46. №. 11. С. 871-875.
239. Попов В.Ф. Лекарственные формы интерферонов. М.: Триада-Х, 2002. 136 с.
240. Sheldon B.W., Stevens K.A., Klapes N.A. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. Vol. 57, № 12. P. 3613-3615.
241. Wiberg N., Wiberg E., Holleman A. Inorganic chemistry San Diego: Academic Press 2001. 1884 p.
242. Dekina S.S, Romanovska I.I., Leonenko I.I. et al. Mucoadhesive gel with immobilized lysozyme: preparation and properties. *Biotechnologia Acta*. 2015. Vol. 8, № 3. P. 41-47.

243. Алексеева А.В., Карцова Л.А. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений. *Журн. аналит. химии*. 2008. Т. 63, № 11. С. 1126-1136.
244. Кудринская В.А., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В. Методы выделения, концентрирования и определения кверцетина. *Журнал аналитической химии*. 2012. Т. 67, № 4. С. 340-353.
245. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия 1970. 362 с.
246. White C.E., Grimaldi F.S. Quercetin as colorimetric reagent for determination of zirconium. *Analytical Chemistry*. 1953. Vol. 25, № 12. P. 1886-1890.
247. Зупанец И.А., Перцев И.М., Шевченко Л.Д. и др. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств. Харьков: УкрФА, 1999. 461 с.
248. Wang X., Quinn P. Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. Springer. 2010. P. 3-25.
249. Петухов В.А., Савельев В.С. Эндотоксиновая агрессия и энтеросорбция. М: "Медицина", 2012. 326 с.
250. Деньга О.В., Левицкий А.П., Макаренко О.А. Экспериментальные методы воспроизведения гингивита: методические рекомендации. Одесса КП «Одеська міська друкарня», 2013. 15 с.
251. Шнайдер С.А., Левицкий А.П., Скиба В.Я. Экспериментальные методы воспроизведения стоматита: методические рекомендации. КП «Одеська міська друкарня», 2015. 20 с.
252. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: "Мир", 1980. 432 с.
253. Крупянко В.И. Коррекция уравнений расчета констант двухпараметрических типов ингибирования и активации ферментов. *Биохимия*. 2007. Vol. 72, № 4. P. 473-485.
254. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. 280 с.

255. Линник Ю.В. Метод наименьших квадратов и основы математико-статистической теории обработки наблюдений. Гос. изд-во физико-математической лит-ры, 1958. 333 с.
256. Wilkinson G.N. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochemical Journal*. 1961. Vol. 80, № 2. P. 324.
257. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М: "Мир", 1990. 350 с.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. И. Романовская, С. Декина, С. Андронати. Конструирование иммобилизованных белковых веществ. – Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG., 2012. – 335 с.
2. Декина С.С., Демьяненко С.А., Левицкий А.П., Романовская И.И. Экспериментальная оценка противовоспалительного действия мукоадгезивных лечебных пленок с лизоцимом // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - № 8. – С. 39-42.
3. Dekina S.S., Romanovskaya I.I., Ovsepyan A.M., Balashova M.V. Sterilization of Ocular Medical Inserts with Immobilized Proteins // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2015. – V.49 (4). – P. 275-279.
4. Dekina S.S., Romanovska I.I., Ovsepyan A.M., Tkach F.N. Development and characterization of mucoadhesive films with immobilized lysozyme // Carbohydrate Polymers. – 2016. – V. 147. – P. 208–215.
5. Romanovskaya I.I., Dekina S.S., Sotnikova E.P., Abramova A.B. Preparation and properties of lysozyme-containing eye drops for tear-substitutive therapy // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2019. – T.53, №8.- P. 755-758 (Scopus, Web of Science).
6. Декина С.С., Романовская И.И., Громовой Т.Ю. Влияние полимеров на процессы ассоциации молекул лизоцима // Biopolymers and cells. – 2011. – V. 27, № 6. – P. 442-445.
7. Декіна С.С., Овсепян А.М, Артеменко А.Г., Романовська І.І., Кузьмін В.Є. Дослідження впливу іонів металів на активність лізоциму методом QSAR аналізу// Мікробіологія і біотехнологія.-2012.- №4 (20).- с. 44-50.
8. Декіна С.С., Романовська І.І., Леоненко І.І., Єгорова А.В. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом: отримання, властивості // Biotechnologia Acta. – 2015. -Т. 8, № 3. – С. 104-109.

9. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Левицький А.П. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. - №3. – С. 30-40.
10. **Dekina S.S.**, Romanovska I.I., Ovsepyan A.M., Bodyul M.G., Toptikov V.A. Isolation and purification of lysozyme from the hen egg white // Biotechnologia Acta – 2015.-V. 8, № 6.- P.41-47.
11. **Декина С.С.**, Романовская И.И., Овсепян А.М., Молодая А.Л., Пашкин И.И. Иммобилизация лизоцима в криогель поливинилового спирта // Biotechnologia Acta – 2014. - Т.7, № 3. - С. 69-73.
12. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Псахіс І.Й., Псахіс Б.Й. Дослідження чутливості мікроорганізмів до комбінацій лізоциму з лікарськими речовинами. // Медична та клінічна хімія. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 68-70.
13. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Севастьянов О.В., Рогожа Є.О. Таблеткові суміші, що містять іммобілізований лізоцим і кверцетин: отримання, властивості // Медична та клінічна хімія. – 2017. – Т.19, № 2. – С. 19-24.
14. 15.Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Шестеренко Ю.А., Сотнікова О.П., Абрамова А.Б., Осташевський В.Л. Лізоцимвмісний препарат для сльозозамінної терапії: фармакотерапевтична ефективність // Медична та клінічна хімія.- 2018. –Т. 20, № 2. – С. 100-104.
- 15.**Декіна С.С.**, Левицький А.П., Романовська І.І., Дем'яненко С.О. Протизапальна дія мукоадгезивних плівок з іммобілізованим лізоцимом на слизову оболонку щоки щурів // Одеський медичний журн. -2011. - № 4. – С. 7-9.
- 16.Романовська І.І., Сотнікова О.П., **Декіна С.С.**, Шестеренко Є.А.. Фізико-хімічні властивості і офтальмонешкідливість очної лікарської мазі з лізоцимом // Медична хімія.- 2012 - Т.14, №3(52).-С. 52-55.
17. Левицький А.П., Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Томіліна Т.В., Хромагіна Л.М., Кнава О.Е. Лікувально – профілактична дія мукоадгезивних плівок з лізоцимом на слизову оболонку порожнини рота після аплікації ліпополісахариду // Одеський медичний журнал.-2014.- № 4 (144). - С. 9-13.

18. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Сотнікова О.П. Лізоцимвмісний препарат "штучна сльоза": отримання, властивості // Мікробіологія і біотехнологія. - 2015. - № 4(32). – С.46-52.
19. **Декіна С.С.**, О.Є Успенський, І.В. Гінжол, М.О. Остафійчук, А.П. Левицький. Вплив оральних аплікацій лізоцимвмісних гелів на стан слизової оболонки щурів після дії ліпополісахариду // Вісник стоматології. – 2016. - № 3. - С. 13-17
20. Sevastyanov O., Romanovska I., Dekina S. Features of the hydrolysis kinetics of *Micrococcus lysodeikticus* by immobilized lysozyme // Innov Biosyst Bioeng. – 2020. - №1(4) - Р. 45–50. doi: 10.20535/ibb.2020.4.1.198291
21. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Севастьянов О.В., Мальцев Г.В. Аналіз компонентів такблеткових сумішей з іммобілізованим лізоцимом // Мікробіологія і біотехнологія. - 2020. - № 1(48). – С. 32-47.
22. **Декина С.С.**, Успенский О.Е., Селиванская И.А., Хромагина Л.Н. Профилактическое действие на десну крыс фитогеля «Лизоцим-форте» при индометациновой интоксикации // Вісник стоматології. - 2019. - №2 (107). – С.14-18.
23. Патент України на корисну модель № 72476. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 8/02 (2006.01), А61К 8/64 (2006.01), А61К 8/65 (2006.01) / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 27.08.2012. Бюл. № 16.
24. Патент України на винахід 99899. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 9/38 (2006.01), А61К 9/40 (2006.01), А61К 38/47 (2006.01), А61Р 31/00 / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 10.10.2012. Бюл. № 19.
25. Патент України на корисну модель 78112 Фітогель для стоматології., МПК (2013.01) А61К 8/30 (2006.01), А61К 8/97 (2006.01), А61Q 11/00 / Левицький А.П., Селіванська І.О., Фурдичко А.І., Ступак О.П., Кнава О.Е., **Декіна С.С.**, Деньга О.В., Гончарук С.В. Опубл. 11.03.2013. Бюл. № 5.
26. Патент України на корисну модель 102170. Антимікробний мукоадгезивний матеріал. МПК А61К 38/46 (2006.01), А61К 31/194

- (2006.01), А61К 31/79 (2006.01) / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Овсепян А.М. Опубл. 26.10.2015. Бюл. № 20.
27. **Декіна С.С.** Исследование поведения молекул лизоцима при иммобилизации в растворы полимеров // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 9-13 апреля 2012 г.) - С. 1-2.
28. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М. Мукоадгезивные полимерные пленки с иммобилизованным лизоцимом. XIV Конференція молодих учених та студентів-хіміків Південного регіону України (Одеса, 25-27 апреля 2012). – С. 47.
29. **Декіна С.С.**, Чернецкая С.В., Слончак В.С., Овсепян А.М. Исследование иммобилизации лизоцима в криогель поливинилового спирта // Матеріали науково-практичної конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології і ароматології» (20 вересня 2013, Одеса). – С. 16-20.
30. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М. Изучение стерилизации иммобилизованных белковых препаратов – перспективных лекарственных средств // XX Международная конференция «Ломоносов 2013» (8-13 апреля 2013, Москва). – С. 1-2
31. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Чернецкая С.В., Слончак В.С. Выделение и частичная очистка лизоцима из белка куриных яиц // XVI Конференция молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28-30 апреля 2014, Одесса). – С. 48.
32. **Декіна С.С.**, Романовская И.И., Овсепян А.М., Левицкий А.П. Лизоцимсодержащие полимерные мукоадгезивные пленки // XI Украинский биохимический конгресс (Киев, 6-10 октября 2014). – С. 163.
33. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Романовська І.І. Розробка мукоадгезивного гелю бактеріолітичної дії // Мат. IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 16-17 жовтня 2014). – С. 215-216.
34. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Бодюл М.Г. Виділення і очищення лізоциму з білка курячого яйця. // Тези доп. конференції-конкурсу молодих учених

- «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня 2015). – С. 22
35. Овсепян А.М., **Декина С.С.** Мукоадгезивный гель с иммобилизованными лизоцимом и кверцетином // Мат. XVII Конференции молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28 апреля – 1 мая 2015, Одесса). – С. 12.
 36. Ovsepyan A., **Dekina S.** Sterilization methods for medicinal films with immobilized proteins // International Conference for Young Scientists "Actual Problems of Microbiology and Biotechnology" (Odesa, 1-4 June, 2015). – P. 8.
 37. Овсепян А.М., **Декіна С.С.** Вплив полімерів на кінетичні параметри лізоциму // Тези доп. конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016» (Київ, 26-27 травня 2016). – С. 36.
 38. Романовская И.И., **Декина С.С.**, Сотникова Е.П. Лизоцимсодержащий препарат для слезозаменительной терапии: получение, физико-химические свойства. // Мат. науково-практичної конф. офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» (19-20 травня 2016, Одеса) - С. 208
 39. Овсепян А.М., **Декина С.С.** Разработка метода выделения высокоочищенного лизоцима из белка куриных яиц // Тез. доп. XVIII Научовой молодіжної конференції «Проблеми та досягнення сучасної хімії» (17-20 травня, Одеса). – 2016. – С. 71.
 40. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Овсепян А.М., Сотнікова О.П., Левицький А.П. Мукоадгезивні лікарські форми лізоциму // Мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016). – С. 344.
 41. **Декина С.С.**, Рогожа Е.А. Разработка и исследование таблетированной формы лизоцима и кверцетина // Мат. XIX наукової молодіжної конференції «Проблеми і досягнення сучасної хімії» (26-28 квітня 2017, Одеса) - С. 33
 42. Shesterenko Y., **Dekina S.**, Romanovska I., Sevastyanov O. Polymeric materials with hydrolytic activity. International conference on biomaterials and

biosensors “4th BIOMATSEN 2019” (Mugla, Turkey, 12-18 May 2019).

-

P. 128.

ДОДАТОК 2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Фізико-хімічного інституту
ім. О.В. Богатського НАН України
академік НАН України

Заступник директора ДУ «Інститут
стоматології і щелепно-лицьової
хірургії НАМН України»,
чл.-кор. УААН, д.м.н., проф.

С.А. Андронаті
« 19 » 2017 р.

А.П. Левицький
« 19 » 2017 р.



А К Т впровадження

Ми, що нижче підписалися, представники Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України, з одного боку та ДУ «Інститут стоматології і щелепно-лицьової хірургії НАМН України» з другого боку, склали цей акт в тому, що результати виконання науково-дослідної роботи (Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України) - «Фізико-хімічні основи створення комплексного антибактеріального препарату сублінгвального застосування» і Договору про спільну науково-дослідну діяльність між Фізико-хімічним інститутом ім. О.В. Богатського НАН України і ДУ «Інститут стоматології і щелепно-лицьової хірургії НАМН України» за темою «Фізико-хімічні основи створення комплексного антидисбіотичного препарату сублінгвального застосування» впроваджені як оздоровчо-профілактичний засіб «ЛІЗОЦИМ-ФОРТЕ» у ДУ «Інститут стоматології і щелепно-лицьової хірургії НАМН України». Таблетки «ЛІЗОЦИМ-ФОРТЕ» вироблені НВА «Одеська біотехнологія» і ТОВ «Біохімтех».

Впроваджений засіб «ЛІЗОЦИМ-ФОРТЕ» має наступні переваги:

1. Новизна і перспективність:

оздоровчо-профілактичні властивості комплексного препарату «ЛІЗОЦИМ-ФОРТЕ» ґрунтуються на використанні стабілізованого шляхом іммобілізації у желатині ензиму антибактеріальної дії – лізоциму, флавоноїду кверцетину, що має високу терапевтичну активність, протизапальну, антиоксидантну, капіляротекторну, протівірусну, канцеростатичну, антитромботичну дії. Пребіотик інулін у складі препарату виборчо активує життєдіяльність і ріст корисної мікрофлори кишківника. Завдяки цьому, враховуючи результати медико-біологічних досліджень, засіб рекомендується для профілактики та усунення дисбіозу і пов'язаних з ним неінфекційних захворювань, особливо стоматологічних і шлунково-кишкових.

2. Порівняння з найкращими вітчизняними аналогами:

завдяки використанню технології іммобілізації ензиму лізоциму для його стабілізації, позитивних терапевтичних властивостей кверцетину і інуліну, комплексний оздоровчо –профілактичний засіб «ЛІЗОЦИМ-ФОРТЕ» не має аналогів в Україні.

Представники Фізико-хімічного
інституту ім. О.В. Богатського
НАН України

Представники ДУ «Інститут
стоматології і щелепно-лицьової
хірургії НАМН України»

Заступник директора з наукової
роботи, завідувача лабораторії
фізико-хімічних основ біотехнології
відділу медичної хімії

Завідуюча лабораторії біохімії

д.б.н., проф. В. М. І.І. Романовська
« 19 » січня 2017 р.

д.б.н., с.н.с. О.А. Макаренко
« 19 » січня 2017 р.

С.н.с. лабораторії фізико-хімічних
основ біотехнології відділу
медичної хімії

к.б.н. С.С. Декіна
« 19 » січня 2017 р.

ДКПІ 10.89.19

УКНД 67.220.20

УЗГОДЖЕНО

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА З ПИТАНЬ
БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ
ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ

Висновок № 602-123-20-2/5734
від «22» 12 2016 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України»,
д. м. н., проф.

С. А. Шнайдер
«23» 12 2016 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

ЗАТВЕРДЖУЮ



Генеральний директор
НВА «Одеська біотехнологія»
І. А. Мусонова
«29» 12 2016 р.

Директор ТОВ
«БІОХІМТЕХ»,
д. б. н., проф.
А. П. Левицький
«29» 12 2016 р.

ДОБАВКА ДІЄТИЧНА «ЛІЗОЦИМ-ФОРТЕ»

МІНЕКОНОМРОЗВИТКУ УКРАЇНИ

Державне підприємство
«Одеський регіональний центр
стандартизації, метрології та сертифікації»
ДП «Одесастандартметрологія»
Ідентифікаційний код 04725970

ПЕРЕВІРЕНО

на відповідність законодавству України

«6» серпня 2017 р.

Внесено до книги обліку за № 0111111111111111

ТЕХНІЧНІ УМОВИ

ТУ У 10.8-37420386-004:2016

Вводяться вперше

Термін дії з 06.01.2017 р.
до 06.01.2020 р.

РОЗРОБЛЕНО

РОЗРОБЛЕНО

РОЗРОБЛЕНО

ДУ «Інститут стоматології
та щелепно-лицевої хірургії
НАМН України»

Зав. лаб. біохімії, д. б. н.

О. А. Макаренко

«21» 11 2016 р.

ТОВ «Біохімтех»

С. н. с., к. т. е. н.

І. О. Селіванська

«21» 11 2016 р.

ФХІ ім. А. В. Богатського
НАН України

Зав. лаб. фізико-хімічних
основ біотехнології

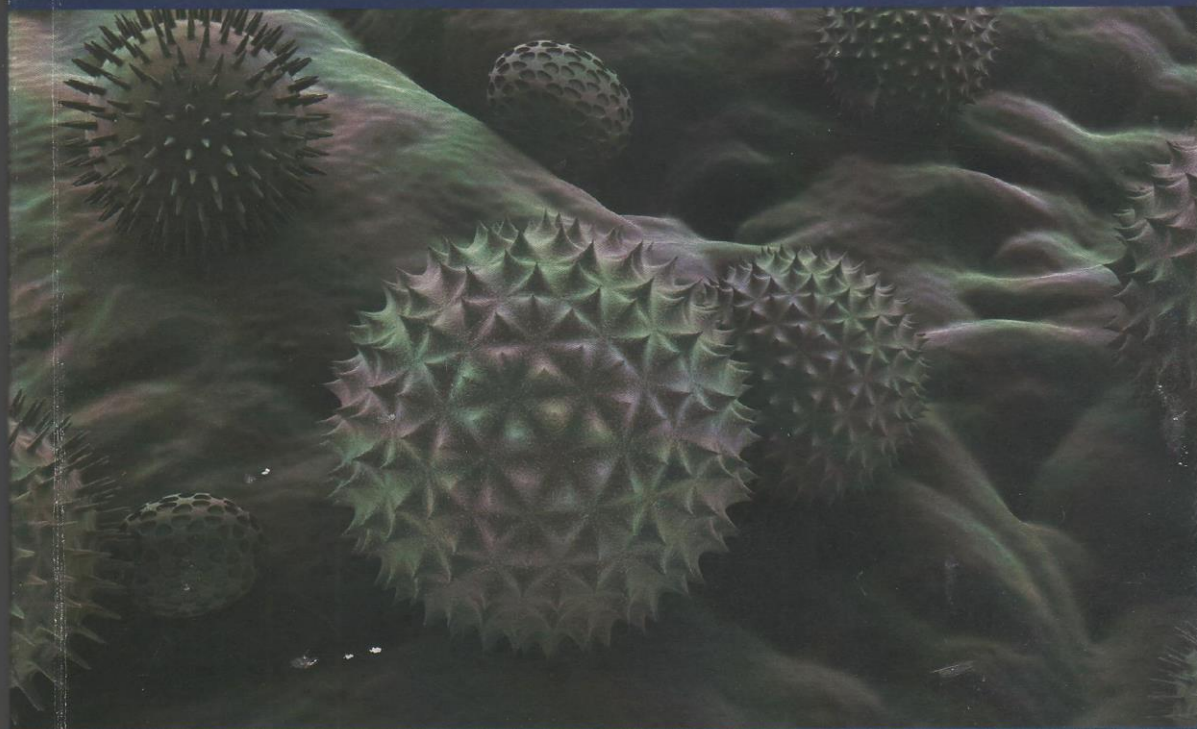
д. б. н., проф.

І. І. Романовська

к. б. н.

С. С. Декіна
«21» 11 2016 р.

2016



И. Романовская
С. Декина
С. Андронати

Конструирование иммобилизованных белковых веществ

Биотехнологические аспекты создания
иммобилизованных на полимерных
носителях белковых веществ для медицины
и экологии



LAMBERT
Academic Publishing

Impressum/Imprint (nur für Deutschland/only for Germany)

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Coverbild: www.ingimage.com

Verlag: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland
Telefon +49 681 3720-310, Telefax +49 681 3720-3109
Email: info@lap-publishing.com

ДА: Одесса, Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, 2011

Herstellung in Deutschland:
Schaltungsdienst Lange o.H.G., Berlin
Books on Demand GmbH, Norderstedt
Reha GmbH, Saarbrücken
Amazon Distribution GmbH, Leipzig
ISBN: 978-3-8484-2659-1

Только для России и стран СНГ

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Издатель: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Germany
Телефон +49 681 3720-310, Факс +49 681 3720-3109
Email: info@lap-publishing.com

Напечатано в России
ISBN: 978-3-8484-2659-1

АВТОРСКОЕ ПРАВО ©2012 принадлежат автору и LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG и лицензиарам
Все права защищены. Saarbrücken 2012